



# Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale: Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique (ED 394)

*CDR St Antoine UMRS938, Equipe Signalisation cellulaire et Carcinogenèse*

## **Caractérisation d'un nouveau mécanisme d'action de la E3 ubiquitine ligase WWP1 et régulation de son activité dans la cancérogenèse**

Par **Thomas COURIVAUD**

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par le Dr. Azeddine Atfi  
Co-directrice: Dr. Céline Prunier

Présentée et soutenue publiquement le 11 septembre 2015

Devant un jury composé de :

Dr. Nathalie THERET  
Dr. François LALLEMAND  
Dr. Mathieu BOISSAN  
Dr. Christian GESPACH  
Dr. Azeddine ATFI  
Dr. Céline PRUNIER

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Président du Jury  
Directeur de Thèse  
Co-directrice de Thèse

## **Remerciements**

*Cette thèse n'aurait pas pu se réaliser sans l'aide de la Ligue Nationale contre le Cancer qui a financé mes trois premières années de thèse, ainsi que de l'Association pour la recherche contre le Cancer, qui a financé ma quatrième année de thèse.*

*Je tiens à remercier le Président de mon jury et tous les membres qui ont accepté de former ce jury de thèse.*

*Je tiens à remercier le Dr. Azeddine Atfi qui m'a permis de réaliser ma thèse dans son laboratoire.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Dr. Céline Prunier, qui a encadré mon stage de Master 2 et mes quatre années de thèses. Merci pour la confiance que tu m'as accordée, ta présence et ton accompagnement au long des ces cinq années.*

*Tu as toujours été là, tu t'es toujours souciée de moi et tu m'as beaucoup appris. Tu es pour beaucoup dans ma décision de faire cette thèse et ce fut toujours un plaisir de travailler avec toi.*

*Mes remerciements vont aussi aux autres membres du laboratoire que j'ai côtoyé pendant quatre ans. Je pense à Laurence pour son œil « extérieur » sur nos travaux et ses conseils précieux, à Nathalie qui m'a guidé durant mon stage de M2, à Olivier, Cécile et Raymond.*

*Je tiens à dire un petit mot à tous les autres étudiants que j'ai croisés pendant ces années de St Antoine. Je pense en particulier à PO, Paul, Anaïs (et Bibinou), Baptiste, Géraldine, Mathieu et tous les autres. Les (quelques) bières au NBA, au BAM et aux Blouses blanches ont été de précieuses alliées pour mener à bien cette thèse.*

*Je tiens aussi à donner ici une place à mes meilleurs amis, Flo, Pierrot, Kinkin, Gary et tous les autres, que je sais toujours où trouver quand j'ai besoin d'eux. « C'est pour la vie les gars ! »*

*Ces remerciements vont aussi bien évidemment à ma famille, qui m'a toujours soutenu dans mes choix, et qui m'a accompagné lors de ce projet. Mes pensées vont à mes parents qui ont toujours été derrière nous, et qui m'ont toujours aidé et laissé libre de mes choix. Et bien sûr à ma sœur, qui veille sur son petit frère et qui a toujours été là pour moi, dans les bons et les mauvais moments.*

*Enfin, un dernier mot pour Caroline, sans aucun doute la plus belle découverte de ma thèse.*

# SOMMAIRE

---

<b>Sommaire .....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>5</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>8</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>9</b>
<b>Chapitre 1 : Le TGF-<math>\beta</math> .....</b>	<b>9</b>
I. La signalisation TGF- $\beta$ .....	10
I. A. Rappel de la voie canonique du TGF- $\beta$ .....	10
I. A. 1. Au niveau membranaire et cytoplasmique.....	10
I. A. 2. Au niveau nucléaire.....	11
I. B. Régulation de la signalisation TGF- $\beta$ .....	14
I. B. 1. Les inhibiteurs.....	14
I. B. 2. Régulation par phosphorylation et déphosphorylation.....	15
I. B. 3. Régulation de la signalisation TGF- $\beta$ par les E3 ubiquitine ligases.....	15
I. C. Les voies non canoniques du TGF- $\beta$ .....	18
I. D. Interconnexion des différentes voies de signalisation du TGF- $\beta$ .....	19
II. TGF- $\beta$ et cancer .....	20
II. A. Rôle suppresseur de tumeur du TGF- $\beta$ .....	20
II. B. Rôle pro-tumoral du TGF- $\beta$ .....	21
II. B. 1. Rôle sur le système immunitaire .....	22
II. B. 2. Rôle sur l'angiogenèse.....	22
II. B. 3. Rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).....	23
II. B. 4. Rôle dans la formation des métastases.....	23
II. C. Altérations de la signalisation TGF- $\beta$ dans les cancers.....	24
<b>Chapitre 2: Ubiquitination .....</b>	<b>26</b>
I. L'ubiquitine et les Ubls.....	26
II. Réaction d'ubiquitination.....	27
III. Déubiquitination.....	28
IV. Différents types d'ubiquitination .....	30
IV. A. La monoubiquitination et la multi-monoubiquitination .....	30
IV. B. La polyubiquitination.....	31
IV. C. Différentes chaînes d'ubiquitine .....	31
V. Les domaines de liaison à l'ubiquitine ou UBD .....	34
VI. Les E3 ubiquitine ligases.....	36

VI. A. Les E3 ligases RING.....	36
VI. B. Les E3 ligases HECT.....	37
<b>Chapitre 3 : La E3 ubiquitine ligase WWP1.....</b>	<b>41</b>
I. Structure .....	41
I. A. Le domaine C2.....	41
I. B. Les domaines WW .....	42
I. C. Le domaine catalytique Hect.....	42
II. Expression génique.....	42
III. Localisation.....	43
IV. Substrats de WWP1.....	43
IV. A. Composants de la signalisation TGF- $\beta$ .....	43
IV. B. La famille des EGFR .....	45
IV. C. Les protéines de la famille KLF .....	46
IV. D. Les protéines de la famille p53.....	47
IV. E. Ezrin.....	48
IV. F. Inducteurs de la différenciation ostéoblastique, Runx2, JunB et CXCR4 .....	48
V. WWP1 et les pathologies.....	50
V. A. Implication de WWP1 dans des maladies infectieuses.....	50
V. B. Implication de WWP1 dans des maladies neurologiques.....	50
V. C. Implication de WWP1 dans la cancérogenèse .....	51
V. C. 1. Surexpression de WWP1 dans les cancers mammaires et prostatiques .....	51
V. C. 2. Fonctions protumorales de WWP1 .....	51
V. C. 3. Fonctions anti-métastatiques de WWP1 .....	52
<b>Chapitre 4 : La RhoGAP STARD13.....</b>	<b>54</b>
I. Structure de STARD13 .....	54
I. A. STARD13, une protéine à domaine START.....	54
I. A. 1. Généralités .....	54
I. A. 2. Le domaine START .....	56
I. A. 3. La sous-famille des RhoGAP-START .....	57
I. B. STARD13, une protéine à domaine RhoGAP .....	57
II. Localisation cellulaire de STARD13.....	58
III. Fonctions biologiques de STARD13 .....	59
III. A. Régulation du cycle cellulaire .....	59
III. A. 1. Inhibition en phase G0/G1 du cycle cellulaire .....	59
III. A. 2. Inhibition du bon déroulement de la mitose .....	61
III. A. 3. Au cours du développement embryonnaire du pancréas .....	62
III. B. Régulation de la migration .....	62
III. C. Régulation de l'invasion.....	63
IV. STARD13, une protéine suppresseur de tumeur.....	64

IV. A. Cancer du foie.....	64
IV. B. Cancer du sein.....	65
IV. C. Cancer du cerveau .....	66
IV. D. Cancer du côlon.....	66
<b>Chapitre 5 : La GTPase RhoA.....</b>	<b>67</b>
I. Les GTPases Rho.....	67
I. A. Classification.....	67
I. B. Cycle d'activation des RhoGTPases.....	69
I. C. Fonctions des RhoGTPases .....	70
II. Structure de RhoA .....	72
III. Fonctions de RhoA.....	72
III. A. Régulation du cytosquelette d'actine.....	72
III. A. 1. mDia1 .....	73
III. A. 2. ROCK.....	74
III. B. Régulation de la migration cellulaire .....	76
III. C. Régulation du cycle cellulaire.....	76
III. C. 1. Phase G1 .....	77
III. C. 2. Mitose.....	78
III. D. Régulation de l'expression génique.....	78
IV. Régulation de la GTPase RhoA.....	79
IV. A. Régulation de RhoA par le système Ubiquitine-Protéasome.....	79
IV. A. 1. Smurf1.....	80
IV. A. 2. Cullin3 .....	82
IV. A. 3. SCF <sup>FBXL19</sup> .....	82
IV. B. Régulation de RhoA par phosphorylation.....	83
IV. C. Régulation de RhoA par les protéines RhoGAPs, GEFs et GDIs.....	84
IV. C. 1. Les protéines RhoGAPs.....	84
IV. C. 1. a. Généralités .....	84
IV. C. 1. b. Régulation des RhoGAPs.....	85
IV. C. 2. Les protéines RhoGEFs .....	86
IV. C. 2. a. La famille des RhoGEFs Dbl .....	86
IV. C. 2. b. La famille des RhoGEFs DOCK.....	87
IV. C. 2. c. Régulation des RhoGEFs.....	87
IV. C. 3. Les protéines RhoGDIs.....	88
IV. C. 3. a. Généralités .....	88
IV. C. 3. b. Fonctionnement des RhoGDIs.....	88
V. RhoA et cancer .....	89
V. A. Mutations et expression génique de RhoA.....	89
V. B. Rôle de RhoA dans les processus de cancérogenèse.....	91

V. B. 1. Régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse.....	91
V. B. 2. Régulation de la migration.....	91
V. B. 3. Rôle de RhoA dans la formation des métastases.....	92
<b>Etat de la question.....</b>	<b>94</b>
<b>Résultats.....</b>	<b>98</b>
<b>Projet 1 : Caractérisation d'un mécanisme de régulation de l'activité catalytique de WWP1 .....</b>	<b>98</b>
Résumé de l'Article 1.....	98
Article 1 : Fonctionnal characterization of a WWP1/Tiul1 tumor derived mutant reveals a paradigm of its constitutive activation in human cancer. ....	102
<b>Projet 2 : Caractérisation d'un mécanisme d'action de WWP1 avec son nouveau partenaire STARD13.....</b>	<b>103</b>
Résumé de l'article 2.....	103
Article 2 : WWP1 and STARD13 function in partnership to target active RhoA for degradation.....	107
<b>Discussion .....</b>	<b>108</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>117</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>137</b>
Présentations et Congrès.....	137

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

$\alpha$ -SMA (Smooth Muscle  $\alpha$ -Actine)  
ADAM12 (A Disintegrin And Metalloproteinase 12)  
AMH (Anti-Mullerian Homone)  
ANG1 (Angiopoïétine 1)  
APC (Anaphase Promoting Complex)  
APCs (Cellules Présentatrices d'Antigènes)  
APC/C (Anaphase Promoting Complexe/Cyclosome)  
ARE (Activin Responding Elements)  
BMP (Bone Morphogenetic Protein)  
Cdk (Cyclines Dépendantes Kinases)  
CNF1 (Cytotoxic Necrotising Factor 1)  
c-PML (cytoplasmic isoform of the of the Promyelocytic Leukemia protein)  
CRL (Cullin RING Ligases)  
CTLs (Lymphocytes T effecteurs)  
Dbl (Diffuse B-cell Lymphoma)  
DH (Dbl Homology)  
DOCK (Dedicator Of Cytokinesis)  
DSBs (Double-Strand Breaks)  
DUB (DeUBiquiting enzymes)  
EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)  
ERM (Ezrin, Radixin, Moesin)  
FAST1 (Forkhead Activin Signal Transducer- 1)  
FH (Formin Homology)  
FHA (ForkheadAssociated)  
GTPases (Guanosine TriPhosphatases)  
HCC (Hépto-Carcinomes)  
HDAC (Histones DéACétylases)

HECT (Homologous to E6-associated protein C-Terminus)  
 IFN- $\gamma$  (Interféron-gamma )  
 JAK (Janus Kinase)  
 KLF (Krüppel-Like Factors)  
 LATS1 (Large Tumor Suppressor 1)  
 LOH (Loss of Heterozygosity)  
 LUBAC (Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex)  
 MAL (Megakaryocytic Acute Leukemia)  
 MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)  
 mDia1 (mammalian homolog of drosophila Diaphaneus 1)  
 MLC (Chaînes Légères de Myosine)  
 MMP (Matrix MetalloProteases)  
 PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor)  
 PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)  
 PH (Pleckstrin Homology)  
 PKA (Protéines Kinases A)  
 PKC (Protein Kinase C)  
 PKG (Protéines Kinases G)  
 RhoGAP (Rho-GTP Activating Protein)  
 RhoGDI (Rho-Guanine-nucleotide Dissociation Inhibitor)  
 RhoGEFs (Rho-Guanine nucleotide Exchange Factors)  
 RING (Really Interesting New Gene)  
 RLDs (Regulator of Chromosome Condensation 1 Like Domain)  
 ROCK (Rho-associated Coiled-coil forming Kinase)  
 RTKs (Récepteurs Tyrosine Kinases)  
 SAM (Sterile Alpha Motif)  
 SARA (Smad Anchor for Receptor Activation)  
 SBD (Smad Binding Domain)  
 SBE (Smad Binding Elements)



SCF (Skp1- Cullin1-F-box protein)

SND1 (Staphylococcal Nuclease Domain-containing 1)

SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic)

Smurf1 (Smad Ubiquitin Regulatory Factor 1)

SRF (Serum Response Factor)

STARD (START Domain Containing)

START [(Streoidogenic acute regulatory protein) Related lipid Transfer]

STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription)

SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier)

TEM (Transition Epithélio-Mésenchymateuse)

TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ )

TGIF (TG-Interacting Factor)

TIEG1 (TGF- $\beta$ -Inducible Early Response Gene 1)

TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)

UBA (Ubiquitin-Associated domain)

UBD (Ubiquitin Binding Domain)

Ubls (Ubiquitine Like proteins)

UIM (Ubiquitin Interacting Motif)

ULPs (Ubiquitin- Like Proteases)

# RESUME

---

## Résumé

La voie de signalisation TGF- $\beta$  joue un rôle biphasique durant la cancérogenèse. Mon laboratoire a identifié une nouvelle protéine inhibitrice de la voie TGF- $\beta$ , WWP1. WWP1 est une E3 ubiquitine ligase qui induit la polyubiquitination et la dégradation du récepteur de type I au TGF- $\beta$ . De plus, le gène *WWP1* est amplifié dans une large proportion de cancers mammaires et prostatiques, suggérant que WWP1 pourrait jouer un rôle clé dans les processus de cancérogenèse liés au TGF- $\beta$ . Mon projet de thèse était donc de caractériser la régulation de l'activité catalytique de WWP1 ainsi que son mécanisme d'action dans la cellule.

Mes résultats montrent qu'à l'état basal, WWP1 est monoubiquitinée, son activité de polyubiquitination étant réduite par l'effet inhibiteur qu'exercent les domaines C2 et/ou WW sur son domaine HECT. En présence de substrats, la protéine WWP1 « s'ouvre » et peut alors induire la polyubiquitination et la dégradation de ses substrats. De plus, nous avons observé qu'un mutant de WWP1, détecté dans un cancer de la prostate, est incapable de s'autoréguler selon ce modèle. Il présente une plus forte activité ligase envers lui-même et ses substrats, ce qui entraîne une atténuation de la réponse cytotatique du TGF- $\beta$  pouvant conférer une activité oncogénique à WWP1.

De plus, nous avons identifié STARD13 comme un nouveau partenaire de WWP1. STARD13 est une protéine à activité RhoGAP, considérée comme un suppresseur de tumeur. Nous avons montré que STARD13 permet l'association de WWP1 avec la GTPase RhoA, entraînant ainsi la polyubiquitination et la dégradation de RhoA. De façon intéressante, le complexe WWP1/STARD13 est impliqué dans le remodelage de l'architecture du cytosquelette en dégradant préférentiellement la forme activée de RhoA. Ces résultats ont permis d'identifier un nouveau rôle de WWP1 qui pourrait jouer un rôle essentiel durant la migration des cellules cancéreuses lors du processus métastatique.

La caractérisation de nouveaux mécanismes de régulation et d'action de WWP1 devrait permettre à terme d'identifier si WWP1 est un marqueur diagnostique dans le cancer et/ou une nouvelle cible thérapeutique pour le développement de médicaments anticancéreux.

*Mots-clés : E3 ubiquitine ligase, WWP1/Tiul1, TGF- $\beta$ , cancer*

## Summary

The TGF- $\beta$  pathway plays a biphasic role during cancerogenesis. My laboratory identified a new protein, WWP1, as a negative regulator of TGF- $\beta$  signaling. WWP1 is an E3 ubiquitin ligase that triggers polyubiquitination and degradation of TGF- $\beta$  type I receptor. A genomic amplification of *WWP1* is found in a large portion of mammary and prostatic tumors, suggesting a key role for WWP1 during carcinogenesis related to TGF- $\beta$ . My thesis project was to determine the regulation of the catalytic activity of WWP1 and a new molecular mechanism of action of WWP1 whose deregulation can be implicated in cancerogenesis.

My results indicate that at steady states, WWP1 is monoubiquitinated, its polyubiquitination activity being silenced due to the inhibitory effects of C2 or/and WW domains on its Hect domain. In presence of substrates, WWP1 is « opened » and induces polyubiquitination and degradation of its substrates. Moreover, a WWP1 mutation found in prostate cancer disrupts this regulatory mechanism. It possesses an increased ligase activity towards itself and its substrates, which leads to the attenuation of TGF- $\beta$  cytotatic signaling, a consequence that could conceivably confer tumorigenic properties to WWP1.

We also identified STARD13 as a novel WWP1 interacting partner. STARD13 has a RhoGAP activity, and is considered as a tumor suppressor. We have shown that STARD13 mediates the association of WWP1 with the GTPase RhoA, ultimately leading to RhoA polyubiquitination and degradation. Interestingly, the WWP1/STARD13 complex is involved in the actin cytoskeleton rearrangement by preferentially targeting the active form of RhoA for degradation. These results reveal a previously unrecognized role for WWP1, which could play a key role in the migration of cancer cells during metastasis.

Characterization of new regulation and action mechanisms for WWP1 should allow identifying whether WWP1 is a diagnosis biomarker in cancer and/or a new therapeutic target for the development of anticancer drugs.

*Keywords: E3 ubiquitin ligase, WWP1/Tiul1, TGF- $\beta$ , cancer*

# INTRODUCTION

---

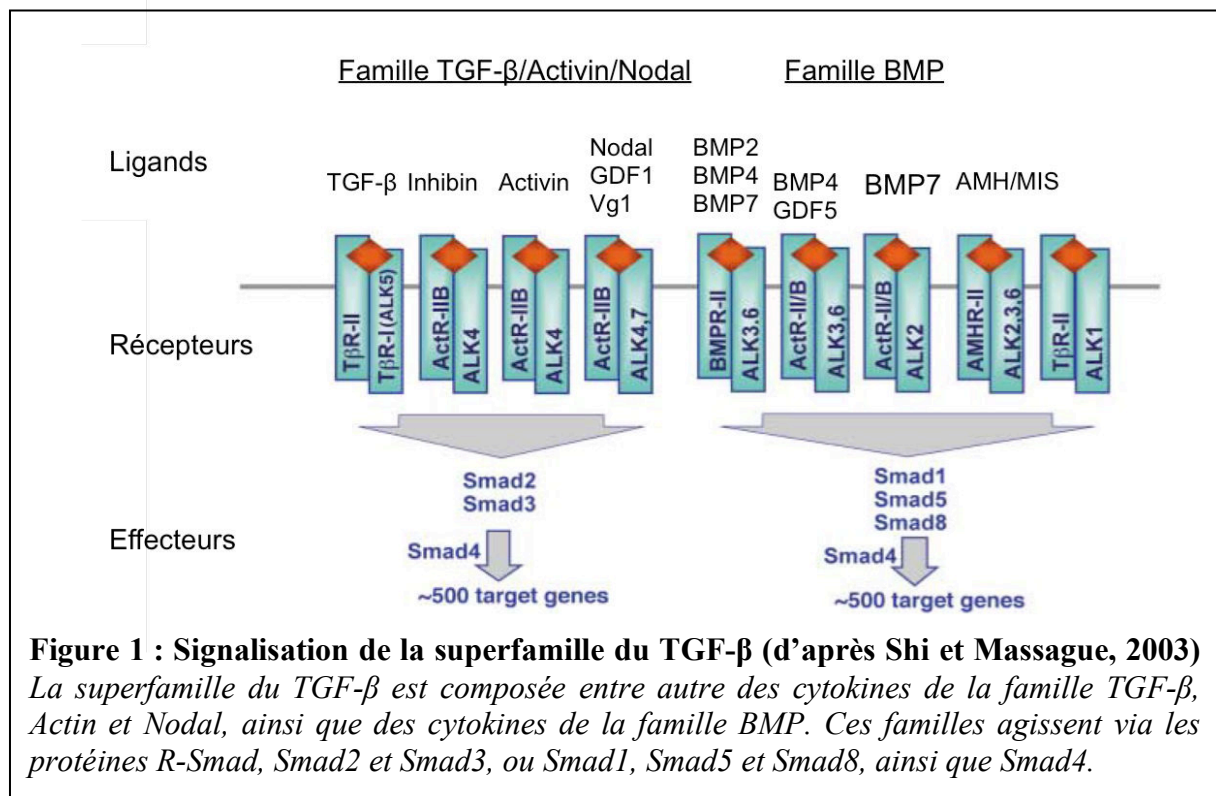
## Chapitre 1 : Le TGF- $\beta$

---

La superfamille du TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) comprend une trentaine de cytokines ayant des homologies dans leur séquence et leur structure. Cette superfamille est divisée en deux grandes sous-familles, d'un côté les cytokines TGF- $\beta$ , Activin/Inhibin et Nodals, et, de l'autre, les cytokines BMP (Bone Morphogenetic Protein) et AMH (Anti-Mullerian Homone) (**Fig.1**) (Massague 1998).

Les membres de cette superfamille possèdent tous un motif « nœud de cystéines » composé de trois ponts disulfures qui ont pour fonction de stabiliser la structure de la protéine.

Ces cytokines jouent un rôle capital dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en régulant de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la migration, l'adhésion, la différenciation ou encore l'apoptose. Elles sont donc impliquées dans des fonctions biologiques aussi diverses que le développement embryonnaire, l'immunité ou la réparation tissulaire. La dérégulation de la signalisation de ces cytokines conduit à l'apparition de différentes pathologies humaines telle que la fibrose, des maladies auto-immunes ou le cancer.



## I. La signalisation TGF-β

Trois isoformes, TGF-β1, TGF-β2 et TGF-β3 composent la sous-famille TGF-β chez les mammifères, la plus répandue étant le TGF-β1. Ces trois isoformes ont toutes un mécanisme d'action similaire. Le TGF-β est synthétisé sous forme de précurseur dont la région C-terminale, après clivage, devient la protéine mature.

### I. A. Rappel de la voie canonique du TGF-β

#### I. A. 1. Au niveau membranaire et cytoplasmique

Le TGF-β exerce son effet par l'intermédiaire de deux récepteurs transmembranaires à activité sérine/thréonine kinase (**Fig.2**). Le TGF-β se fixe sur le récepteur de type II (TβRII), ce qui permet le recrutement du récepteur de type I (TβRI). Dans ce complexe, TβRII phosphoryle TβRI au niveau de son domaine GS, riche en Glycine et Serine, ce qui entraîne son activation (Massague 1998, Shi and Massague 2003).

TβRI activé peut alors reconnaître spécifiquement des protéines R-Smads (Receptor-

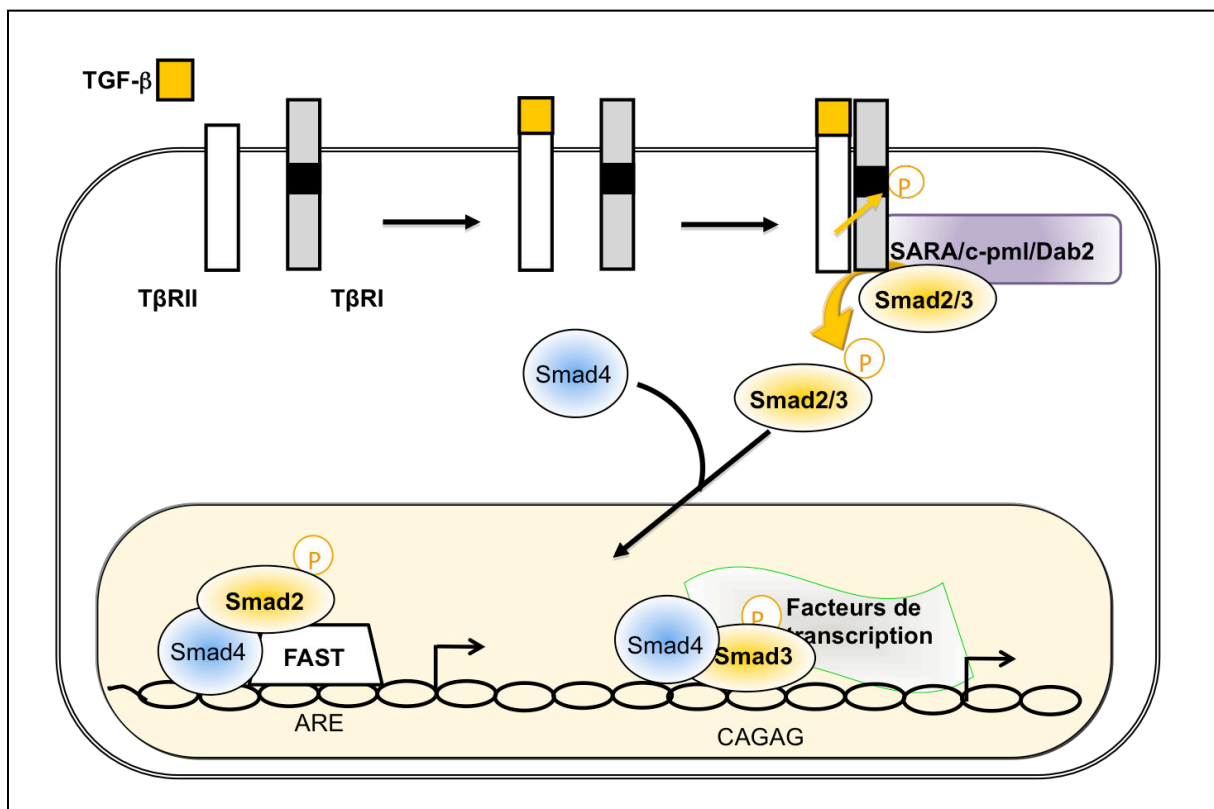
activated Smads). Ces protéines regroupent Smad2 et Smad3, reconnues par les récepteurs aux TGF- $\beta$  et aux Activins, et les protéines Smad1, Smad5 et Smad8, reconnues par les récepteurs aux BMP (**Fig.1**). Les protéines R-Smads sont formées de deux domaines conservés N-terminal et C-terminal reliés par une région moins conservée appelée "linker". Le domaine N-terminal, appelé MH1 (pour Mad Homology 1), est un domaine permettant aux R-Smads de se lier à l'ADN (Shi, Wang et al. 1998). Le domaine C-terminal appelé MH2 est le domaine responsable de l'homodimérisation et l'hétérodimérisation des protéines R-Smads. A l'état basal, les domaines MH1 et MH2 des R-Smads sont « repliés » l'un sur l'autre et exercent une répression mutuelle. Cette autoinhibition est levée par la phosphorylation des R-Smads par T $\beta$ RI activé. T $\beta$ RI activé phosphoryle les R-Smads sur les sérines de la séquence SSxS située à l'extrémité C-terminale du domaine MH2. Suite à cette activation, les protéines R-Smads se lient à une autre protéine Smad, appelée Co-Smad: Smad4. Smad4 a une structure similaire aux R-Smads mais ne possède pas la séquence SSxS et n'est donc pas phosphorylée par T $\beta$ RI. L'interaction des R-Smads activées avec Smad4 est nécessaire à leur translocation nucléaire (**Fig.2**).

L'activation de T $\beta$ RI et des protéines R-Smads sont les deux événements initiaux de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  et sont régulés, positivement ou négativement, par plusieurs protéines. Les protéines SARA (Smad Anchor for Receptor Activation), c-pml (cytoplasmic promyelocytic leukemia protein) ou Dab2 (Disabled homolog 2) sont, par exemple, nécessaires pour que les R-Smads soient phosphorylées par T $\beta$ RI activé (Massague 1998). La protéine ADAM12 (A Disintegrin And Metalloproteinase 12) a été montrée comme induisant la localisation de T $\beta$ RII au niveau des endosomes primaires, ce qui permet de stabiliser T $\beta$ RII et donc de favoriser la signalisation TGF- $\beta$  (Atfi, Dumont et al. 2007). La protéine FKBP12 est, quant à elle, un régulateur négatif de l'activation de T $\beta$ RI par T $\beta$ RII. En effet, FKBP12 interagit avec T $\beta$ RI au niveau de sa région GS en absence de TGF- $\beta$ , inhibant ainsi une phosphorylation basale de T $\beta$ RI par T $\beta$ RII (Chen, Liu et al. 1997).

## **I. A. 2. Au niveau nucléaire**

Une fois activé et transloqué dans le noyau, le complexe R-Smad-Smad4 peut se lier à l'ADN sur des séquences SBE (Smad Binding Elements) en amont de gènes cibles du TGF- $\beta$  et ainsi réguler leur transcription (Dennler, Itoh et al. 1998) (**Fig.2**). Il est à noter que Smad2, qui possède une insertion de 30 acides aminés dans son exon 3 par rapport à Smad3, ne peut pas se lier directement à l'ADN, contrairement à Smad3 (Yagi, Goto et al. 1999). La séquence

ACAG est la première séquence SBE identifiée ; elle est suffisante pour se lier aux complexes R-Smad/Smad4, la séquence CACAG permettant, elle, une fixation optimale. Les séquences SBE étant courtes et peu spécifiques, elles ne sont pas suffisantes pour que les protéines Smads activent la transcription de gènes cibles. Les complexes de protéines Smads vont donc se lier à des protéines de liaison à l'ADN, qui vont agir comme des adaptateurs des protéines Smads, pour se lier à des séquences précises de l'ADN. Certains de ces adaptateurs ne peuvent se lier qu'à Smad2 ou Smad3, ou alors seulement à Smad1 ou Smad5, ce qui va permettre d'assurer la spécificité du signal.



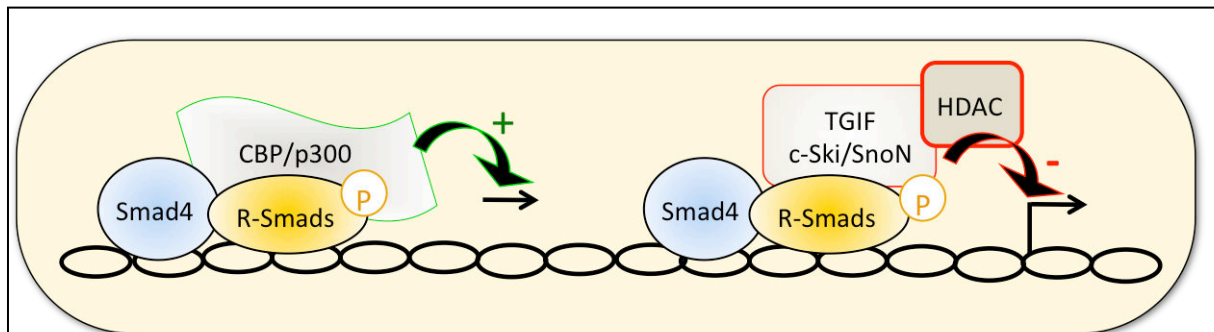
**Figure 2: La signalisation TGF-β**

*Le TGF-β se fixe sur un récepteur membranaire de type II (TβRII). Celui-ci active alors un récepteur de type I (TβRI), en le phosphorylant. TβRI phosphoryle alors les protéines R-Smads qui se complexent avec Smad4 et sont transloquées dans le noyau. Le complexe Smad recrute alors des protéines de liaison à l'ADN et régule la transcription de gènes cibles du TGF-β.*

Le premier cofacteur identifié pour Smad2 fut la protéine FAST1. FAST1 se lie à des séquences d'ADN ARE (Activin Responing Elements). FAST1 peut interagir avec Smad2 ou Smad3 en complexe avec Smad4, mais pas avec les R-Smads de la voie BMP (Chen, Hata et al. 1998). Aujourd'hui, de nombreux cofacteurs liant l'ADN et les protéines Smads ont été identifiés tels que les protéines de la famille Runx, Runx1, Runx2 et Runx3 (Ito and

Miyazono 2003). Ces protéines adaptatrices des différentes protéines Smads permettent leur liaison spécifique sur des promoteurs de gènes cibles.

Lorsqu'ils sont fixés à l'ADN, les complexes de protéines Smads peuvent soit activer soit réprimer la transcription de gènes cibles. Cette capacité à réguler la transcription est principalement due au fait que les Smads peuvent recruter des coactivateurs ou des corépresseurs transcriptionnels (**Fig.3**).



**Figure 3: Recrutement de coactivateurs et corépresseurs par les Smads**

*Les complexes Smad peuvent recruter, soit des coactivateurs transcriptionnels comme CBP ou p300, qui possèdent une activité HAT (Histone Acétyl Transférase), des corépresseurs transcriptionnels comme TGIF, c-ski ou SnoN qui se lient à des HDAC (Histone DéACétylases).*

Les principaux co-activateurs transcriptionnels recrutés par les Smads sont des co-activateurs généraux de la transcription : les protéines p300 et CBP (Feng, Zhang et al. 1998, Janknecht, Wells et al. 1998, Pouponnot, Jayaraman et al. 1998). Ces deux protéines possèdent une activité histone acétyl transférase (HAT) qui permet le transfert de groupements acétyl sur des résidus lysines d'histones. L'acétylation des histones entraîne la modification de la structure des nucléosomes ; la chromatine se décompacte, ce qui permet à la machinerie transcriptionnelle d'accéder à la chromatine et d'activer la transcription des gènes cibles. L'interaction entre p300 et CBP et les Smads se fait grâce au domaine MH2 de ces dernières.

Les complexes de protéines Smads peuvent aussi recruter des corépresseurs transcriptionnels, tels que les protéines TGIF, c-Ski ou SnoN. TGIF est une protéine à homéodomaine qui interagit avec les protéines Smad2 et Smad3. TGIF réprime la transcription de gènes cibles en recrutant des histones déacétylases (HDAC). L'effet répresseur du TGIF vient également du fait que celui-ci est en compétition avec p300 pour se lier aux Smads. Il est à noter que l'interaction entre les Smads et TGIF est dépendante de la présence de TGF- $\beta$  (Wotton, Lo et al. 1999). Deux autres corépresseurs importants de la

signalisation TGF- $\beta$  sont les protéines c-Ski et SnoN (Akiyoshi, Inoue et al. 1999, Luo, Stroschein et al. 1999, Sun, Liu et al. 1999). Ces deux protéines agissent comme des répresseurs des complexes comprenant Smad2 et Smad3 en recrutant des HDAC grâce à la protéine adaptatrice N-Cor. Contrairement à TGIF, c-Ski et SnoN répriment la transcription basale de gènes cibles en absence de TGF- $\beta$ . Or, cette répression disparaît dans les premières heures après stimulation au TGF- $\beta$ . TGIF semble donc réprimer des complexes de Smads activés alors que c-Ski et SnoN protègent la transcription non spécifique des Smads à l'état basal.

Par ailleurs, c-Ski et TGIF sont aussi capables d'inhiber l'initiation de la signalisation TGF- $\beta$  en supprimant la phosphorylation des Smads. c-Ski peut en effet séquestrer les protéines R-Smads au niveau de T $\beta$ RI et TGIF empêcher la phosphorylation des R-Smads en séquestrant c-pml au niveau du noyau (Seo, Ferrand et al. 2006, Ferrand, Atfi et al. 2010).

La signalisation TGF- $\beta$  et sa régulation transcriptionnelle sont donc des mécanismes très dynamiques impliquant de nombreuses protéines. Après le stimulus TGF- $\beta$ , les récepteurs membranaires sont activés, puis les protéines R-Smads. Celles-ci se complexent à Smad4 et vont dans le noyau pour réguler la transcription de gènes cibles. Ces différents niveaux de la voie de signalisation TGF- $\beta$  sont finement régulés.

## **I. B. Régulation de la signalisation TGF- $\beta$**

### **I. B. 1. Les inhibiteurs**

Une autre classe de protéines Smads, les Smads inhibiteurs (I-Smads), regroupant Smad6 et Smad7, régule négativement la signalisation TGF- $\beta$ . Smad6 inhibe spécifiquement la voie des BMP alors que Smad7 peut inhiber la voie TGF- $\beta$  ou Activin. Smad7 inhibe la signalisation TGF- $\beta$  par différents mécanismes. Smad7 peut agir dans le noyau en inhibant la formation des complexes R-Smad-ADN (Zhang, Fei et al. 2007). Smad7 agit également au niveau de T $\beta$ RI. Smad7 entre en effet en compétition avec les R-Smads pour leur interaction avec T $\beta$ RI et inhibe ainsi leur activation (Hayashi, Abdollah et al. 1997). Smad7 peut aussi induire la déphosphorylation de T $\beta$ RI en recrutant la phosphatase 1 $\alpha$  (PP1 $\alpha$ ) (Valdimarsdottir, Goumans et al. 2006). Enfin, Smad7 permet la dégradation de T $\beta$ RI en recrutant des E3 ubiquitine ligases comme Smurf1 ou WWP1 (**cf. Chapitre 1/ I. B. 3**). Il est à noter que le TGF- $\beta$  induit la transcription de Smad7 et permet également la translocation de Smad7 du noyau vers le



cytoplasme. Smad7 exerce donc un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation TGF- $\beta$  (Hua, Miller et al. 2000, Stopa, Anhuf et al. 2000).

### **I. B. 2. Régulation par phosphorylation et déphosphorylation**

La voie du TGF- $\beta$  est également régulée par phosphorylation ou déphosphorylation de certains de ses composants. L'activation de la voie Ras/MAPK par le facteur EGF (Epidermal Growth Factor) induit par exemple la phosphorylation des protéines R-Smads au niveau de la région du linker. Cette phosphorylation empêche les protéines Smad2 et Smad3 d'être transloquées dans le noyau et d'activer la transcription de gènes cibles du TGF- $\beta$  (Macias-Silva, Abdollah et al. 1996, Kretzschmar, Doody et al. 1999). Les protéines R-Smads peuvent aussi être phosphorylées dans le noyau par les Cyclines Kinases Cdk8 et Cdk9 au niveau de résidus du linker, différents de ceux phosphorylés par la voie Ras/MAPK. Cette phosphorylation induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle des R-Smads mais également leur association à la E3 ubiquitine ligase Nedd4-L et leur dégradation consécutive, entraînant ainsi la terminaison du signal TGF- $\beta$  (Alarcon, Zaromytidou et al. 2009).

De nombreuses phosphatases ont également été identifiées comme régulant la voie TGF- $\beta$ . Ainsi, la phosphatase PP1 $\alpha$ , en association avec Smad7, induit la déphosphorylation de T $\beta$ RI et son inactivation (Valdimarsdottir, Goumans et al. 2006). La phosphatase PPM1A est elle une phosphatase qui cible la phosphorylation des R-Smad au niveau de leur motif SSXS, inhibant leur association à Smad4 et entraînant leur sortie du noyau (Lin, Duan et al. 2006). Au contraire, les phosphatases SCP 1 à 3 (Small C-terminal domain Phosphatases) ciblent la phosphorylation des R-Smads, induite par EGF, au niveau de leur région du linker et permettent la progression du signal TGF- $\beta$  (Liu and Feng 2010).

### **I. B. 3. Régulation de la signalisation TGF- $\beta$ par les E3 ubiquitine ligases**

Plusieurs E3 ubiquitine ligases, dont WWP1 (**cf. Chapitre 3/ IV. A**) régulent des éléments de la signalisation TGF- $\beta$  notamment *via* leur dégradation par le système Ubiquitine-Protéasome (**Fig.4**) (**cf. Chapitre 2/ IV. C.**) (Inoue and Imamura 2008).

Parmi les premières E3 ubiquitine ligases décrites comme régulant la voie du TGF- $\beta$  (et BMP) figurent les E3 ligases Smurf1 (Smad Ubiquitin Regulatory Factor 1) et Smurf2. Smurf1 et Smurf2 sont des régulateurs négatifs de la signalisation TGF- $\beta$  parce qu'elles

entraînent l'ubiquitination et la dégradation de différents acteurs de cette signalisation (Inoue and Imamura 2008).

Smurf1 peut interagir avec les protéines Smads inhibitrices Smad6 et Smad7. Suite à cette interaction, Smad7 est transloqué dans le cytoplasme, et sert d'adaptateur à Smurf1 pour que celui-ci soit recruté au niveau de T $\beta$ RI activé (Ebisawa, Fukuchi et al. 2001). Il est à noter que l'interaction entre Smad7 et Smurf1 et leur translocation cytoplasmique sont induites par le TGF- $\beta$ , celui-ci induisant notamment la transcription de Smad7 (Stopa, Anhufer et al. 2000). Une fois recruté à ce complexe, Smurf1 induit la polyubiquitination et la dégradation par le protéasome de T $\beta$ RI ainsi que de Smad7 (Ebisawa, Fukuchi et al. 2001, Suzuki, Murakami et al. 2002).

Smurf2 peut également interagir avec Smad7. De manière similaire à Smurf1, l'interaction de Smad7 et Smurf2 permet la translocation des deux protéines dans le cytoplasme et notamment au niveau du complexe des récepteurs activés au TGF- $\beta$ . Smurf2 peut alors catalyser la polyubiquitination de Smad7 et T $\beta$ RI activé, entraînant leur dégradation (Kavasaki, Rasmussen et al. 2000, Suzuki, Murakami et al. 2002). En présence de TGF- $\beta$ , Smurf2 peut aussi s'associer et polyubiquitiner Smad2, ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome (Lin, Liang et al. 2000). Cette interaction entre Smurf2 et Smad2 entraîne également la liaison de Smurf2 au corépresseur transcriptionnel SnoN. Smurf2 peut alors polyubiquitiner SnoN, induisant sa dégradation par le protéasome (Bonni, Wang et al. 2001). SnoN est également dégradée suite à sa polyubiquitination par la E3 ligase APC (Anaphase Promoting Complex) (**Fig.4**). De manière similaire aux protéines Smurfs, les R-Smads servent aussi d'adaptateurs à APC pour que celle-ci interagisse et polyubiquitine SnoN (Stroschein, Wang et al. 1999).

Enfin, il a été montré que la E3 ubiquitine ligase AIP4 (Atrophin A-Interacting Protein 4), aussi appelée Itch, peut également s'associer à Smad7. AIP4 peut polyubiquitiner Smad7 et induire sa dégradation (Lallemand, Seo et al. 2005).

La E3 ubiquitine ligase Arkadia est, elle, un régulateur positif de la signalisation TGF- $\beta$  et BMP. En effet, Arkadia interagit avec la protéine Smad7 et induit sa polyubiquitination et sa dégradation (Koinuma, Shinozaki et al. 2003). De plus, Arkadia peut aussi polyubiquitiner les corépresseurs transcriptionnels c-Ski et SnoN, ce qui participe ainsi à augmenter le signal TGF- $\beta$  (Levy, Howell et al. 2007).

E3 Ligases	Protéines Substrats	Protéines Adaptatrices	Mécanisme d'action
Smurf1	TβRI Smad7	Smad6/7	Smurf1 entraîne la dégradation de TβRI et de Smad7.
Smurf2	TβRI Smad7 Smad2 SnoN	Smad7	Smurf2 entraîne la dégradation de TβRI et de Smad7. Smurf2 ubiquitine Smad2 et leur interaction est augmentée par la stimulation au TGF-β. Smurf2 ubiquitine SnoN et entraîne sa dégradation.
Nedd4-2	SnoN TβRI Smad2 Smad4	Smad2 Smad7 Smad7	Nedd4-2 entraîne la dégradation de TβRI et de SnoN. L'ubiquitination de Smad2 est augmentée par le TGF-β. Nedd4-2 ubiquitine Smad2 et Smad4.
WWP1	TβRI Smad2/3 Smad4	Smad7 TGIF	Dégradation de TβRI. Dégradation de Smad2/3 et Smad4.
AIP4	Smad2		AIP4 ubiquitine Smad2 et augmente sa phosphorylation. Leur interaction est augmentée par la stimulation au TGF-β.
Arkadia	Smad7 SnoN/c-Ski	Axin	Arkadia induit la dégradation de Smad7, SnoN et c-Ski et augmente la signalisation TGF-β.
ROC1-SCF <sup>Fbw1a</sup>	Smad3 Smad4		Dégradation de Smad3 et 4.
SCF <sup>Skp2</sup>	Smad4		SCF <sup>Skp</sup> entraîne la dégradation de certains mutants de Smad4 mais pas de la protéine sauvage.
CHIP	Smad1/4		Dégradation de Smad1, Smad3 et Smad4.
Ectodermin	Smad4		Monoubiquitination de Smad4 empêchant son association avec Smad2 et Smad3, ce qui inhibe la signalisation TGF-β.
APC	SnoN	Smad3	Ubiquitination et dégradation de SnoN.

**Figure 4: Exemple de E3 ubiquitine ligases régulant la voie TGF-β (d'après Inoue et al, 2008)**

Les E3 ubiquitine ligases peuvent aussi réguler la voie TGF- $\beta$  par d'autres mécanismes que la polyubiquitination et la dégradation de ses composants. Par exemple, la E3 ubiquitine ligase Ectodermin/TIF1- $\gamma$  monoubiquitine Smad4, ce qui empêche son association avec Smad2 et Smad3 et inhibe la signalisation TGF- $\beta$  (Dupont, Mamidi et al. 2009). Il est aussi à noter que la polyubiquitination de Smad2 par AIP4 peut augmenter sa phosphorylation et donc le signal TGF- $\beta$  (Bai and Cao 2002). AIP4 peut aussi entraîner la dégradation de T $\beta$ RI activé, mais sans l'ubiquitiner. Indépendamment de son activité ubiquitine ligase, AIP4 régule en effet la stabilité de T $\beta$ RI activé en augmentant son interaction avec Smad7 (Lallemand, Seo et al. 2005).

De manière complémentaire, la signalisation TGF- $\beta$  peut aussi être régulée par les enzymes déubiquitinases (DUBs) (**cf. Chapitre 2/ III.**). Les DUBs sont des enzymes responsables de la déubiquitination des protéines, ce qui leur permet notamment de prévenir la dégradation de protéines polyubiquitinées. Ainsi, il a été montré que les DUBs USP4 et USP15 permettent de prolonger le signal TGF- $\beta$ . En effet, ces deux enzymes peuvent déubiquitiner T $\beta$ RI, ce qui va empêcher sa dégradation par le protéasome. De manière intéressante, USP15 ne se lie pas directement à T $\beta$ RI mais nécessite l'intermédiaire de Smad7. USP15 a aussi été montré comme étant capable de déubiquitiner les protéines Smads (Inui, Manfrin et al. 2011, Aggarwal and Massague 2012).

## **I. C. Les voies non canoniques du TGF- $\beta$**

L'induction de différents effets biologiques par le même facteur TGF- $\beta$  se fixant sur un même type de récepteur laisse supposer que la transduction des messages du TGF- $\beta$  passe par des voies de signalisation multiples.

Il est maintenant admis que le TGF- $\beta$  active également d'autres voies de signalisation que celle des Smads, notamment celle impliquant la kinase JNK (c-Jun N-terminal Kinase). En effet, le TGF- $\beta$  induit l'activation séquentielle de la MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) kinase kinase 1 (MEKK1), de la MAPK kinase 4 (MKK4), puis de la kinase JNK, qui phosphoryle et active le facteur de transcription c-Jun. Les kinases p38 et ERK sont aussi activées par le TGF- $\beta$  *via* respectivement les kinases MKK3/6 et MEK1 (Atfi, Djelloul et al. 1997, Engel, McDonnell et al. 1999, Hanafusa, Ninomiya-Tsuji et al. 1999). L'activation de p38 est dépendante de la protéine RhoGTPase RhoA puisque l'expression de la forme dominante-négative de celle-ci inhibe l'activation de p38 par le TGF- $\beta$  (Engel, McDonnell et al. 1999). Le TGF- $\beta$  peut également activer Akt *via* l'activation de la kinase PI3K

(Phosphoinositides 3-kinase). Ceci requiert bien l'activité kinasique de T $\beta$ RI mais est indépendant des Smads (Zhang 2009).

Fonctionnellement, il a été montré que le TGF- $\beta$  activait la GTPase RhoA (**cf. Chapitre 1/ II. B. 3**), et son effecteur ROCK, lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules de glandes mammaires normales de souris (NMuMG). En effet, l'expression d'une forme dominante négative de RhoA inhibe la TEM induite par le TGF- $\beta$  (Bhowmick, Ghiassi et al. 2001). Cette TEM induite par le TGF- $\beta$  semble également nécessiter l'activation de la kinase p38, puisqu'un inhibiteur de p38 réduit la TEM de cellules NMuMG stimulées au TGF- $\beta$ . L'inhibiteur de p38 inhibe également l'apoptose de ces cellules en réponse au TGF- $\beta$ . De manière intéressante, les auteurs ont utilisé un mutant de T $\beta$ RI incapable de reconnaître et de se lier à Smad2 ou Smad3, mais possédant toujours son activité kinasique. Dans les cellules NMuMG surexprimant ce mutant, le TGF- $\beta$  est toujours capable d'induire l'apoptose. En revanche, la TEM n'est pas complète par rapport aux cellules exprimant le récepteur non muté. Ceci indique que l'apoptose, et en partie la TEM, induites par le TGF- $\beta$ , nécessitent l'activation de la MAP kinase p38, de manière indépendante de la voie des Smads (Yu, Hebert et al. 2002).

## **I. D. Interconnexion des différentes voies de signalisation du TGF- $\beta$**

Certains gènes dont la transcription est activée par le TGF- $\beta$ , comme *PAI-1* (Plasminogen Activator Inhibitor), possèdent des séquences dans leur promoteur qui sont reconnues par des Smads, adjacentes à des séquences reconnues par des facteurs de transcription activés par la voie des MAPK, suggérant que différentes voies de signalisation activées par le TGF- $\beta$  contribuent à la transmission du signal TGF- $\beta$ . Les voies des kinases JNK et p38 peuvent ainsi moduler l'activation transcriptionnelle des protéines Smads en réponse au TGF- $\beta$ . En effet, ces kinases peuvent activer ou induire certains facteurs de transcription qui, en s'associant à Smad2 ou Smad3, vont réguler la transcription de gènes cibles en réponse au TGF- $\beta$ . Par exemple, le TGF- $\beta$  réprime la transcription du gène *Id1* par l'association du complexe Smad3/4 avec le facteur de transcription ATF3 (Activatin Transcription Factor 3), activé par JNK et p38 (Miyazono and Miyazawa 2002). L'activation de la voie JNK par le TGF- $\beta$  peut aussi inhiber l'activité transcriptionnelle de Smad2 et Smad3. En effet, le facteur de transcription c-Jun stabilise l'association de Smad2 et Smad3 avec le répresseur transcriptionnel TGIF, inhibant ainsi l'activité transcriptionnelle de ces R-Smads (Dennler,

Prunier et al. 2000, Pessah, Prunier et al. 2001).

D'autres voies de signalisation participent également à l'inhibition des effets du TGF- $\beta$ . Le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) et l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ), en activant respectivement NF $\kappa$ B et les kinases JAK1 et STAT1 induisent la transcription du gène *Smad7*, ce qui conduit à inhiber la voie TGF- $\beta$  (Ulloa, Doody et al. 1999, Bitzer, von Gersdorff et al. 2000).

## II. TGF- $\beta$ et cancer

Grâce à ses effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques, le TGF- $\beta$  est un suppresseur de tumeur majeur dans la cellule. Cependant, dans les stades tardifs de la cancérogenèse, le TGF- $\beta$  a un effet protumoral, en favorisant notamment le développement de métastases. Le TGF- $\beta$  exerce donc un rôle biphasique selon les stades du cancer.

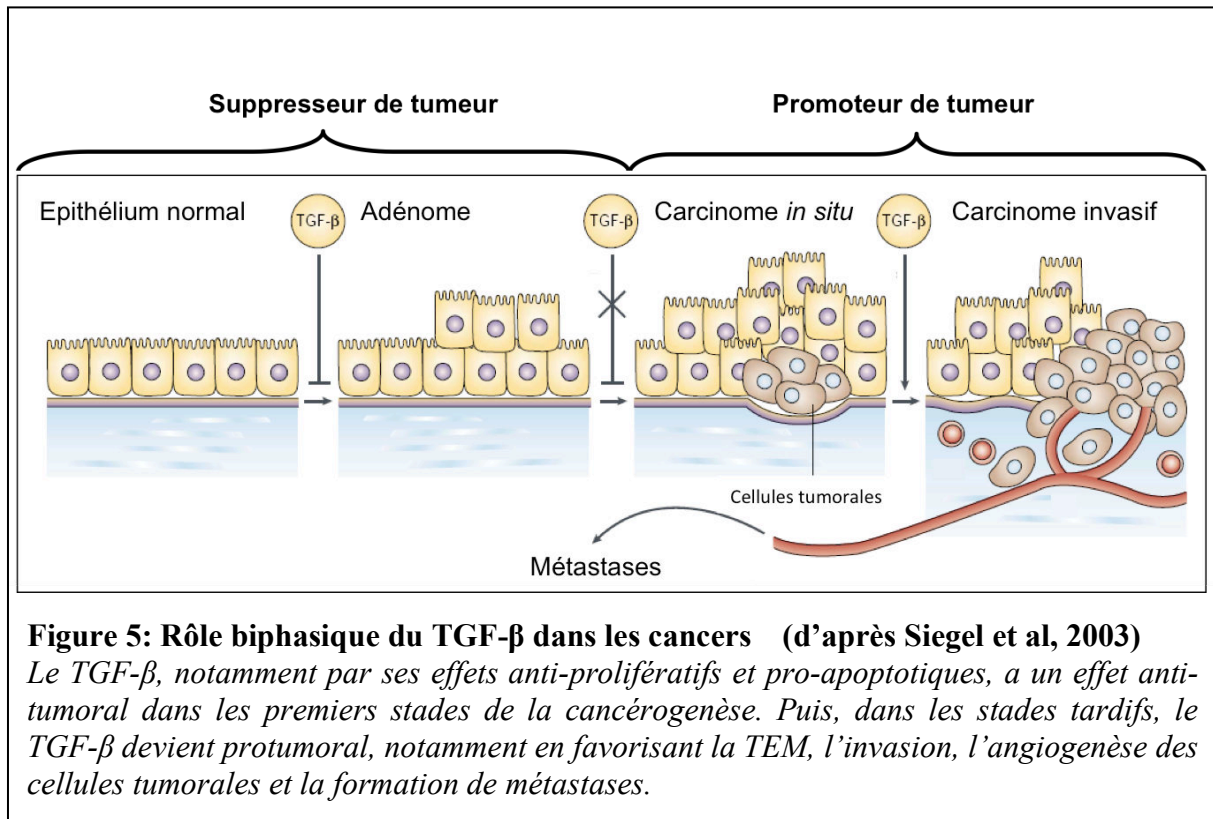
### II. A. Rôle suppresseur de tumeur du TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  exerce un rôle de suppresseur de tumeur dans les premiers stades de la cancérogenèse (Derynck, Akhurst et al. 2001, Imamura, Hikita et al. 2012) (**Fig.5**). Il exerce cet effet suppresseur de tumeur notamment grâce à son action anti-proliférative. Le TGF- $\beta$  est en effet un puissant inhibiteur de la prolifération de nombreux types cellulaires comme les cellules épithéliales, endothéliales, lymphoïdes ou encore myéloïdes. Il exerce son effet anti-prolifératif principalement en induisant l'expression de *p15* et *p21*, deux inhibiteurs du cycle cellulaire, ainsi qu'en inhibant l'expression du proto-oncogène *c-Myc*. Ainsi, plus de 85% des lignées cellulaires cancéreuses d'origine épithéliales ont une résistance aux effets anti-prolifératifs du TGF- $\beta$ . Ceci peut être dû à des mutations inactivantes, délétions ou surexpression de composants de la signalisation TGF- $\beta$  (**cf Chapitre 1/ II. C**).

Le TGF- $\beta$  est aussi un facteur pro-apoptotique dans la plupart des types cellulaires en activant différents gènes, dont *TIEG1* (TGF- $\beta$ -inducible early response gene 1), un facteur de transcription qui régule l'expression de gènes pro-apoptotiques dans plusieurs types de cellules épithéliales, notamment du pancréas et du foie (Tirado-Rodriguez, Ortega et al. 2014), ou *DAPK*, qui induit l'apoptose dans les hépatomes (Kiyono, Suzuki et al. 2009).

Le TGF- $\beta$  exerce également une action anti-inflammatoire. Ainsi, les souris knock-out pour le TGF- $\beta$  meurent d'une réaction inflammatoire généralisée quelques jours après la

naissance (Kulkarni and Karlsson 1993). Or, une inflammation chronique accroît les risques de cancer. Le risque de développer un cancer est par exemple accru dans la maladie de Crohn.



## II. B. Rôle pro-tumoral du TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  a en réalité un rôle biphasique dans les cancers. Ceci a été bien mis en évidence par Cui et ses collaborateurs en 1996. Ils ont montré que des souris transgéniques surexprimant TGF- $\beta$ 1, spécifiquement dans les kératinocytes, étaient plus résistantes à la formation de tumeurs bénignes de la peau, mais, en revanche, elles présentaient un taux de tumeurs malignes beaucoup plus élevé, reflétant le double rôle du TGF- $\beta$  dans les cancers (Cui, Fowles et al. 1996). En effet, dans les stades plus avancés du cancer, le TGF- $\beta$  favorise au contraire les processus de cancérogenèse (**Fig.5**). Dans ces stades tardifs, les cellules cancéreuses peuvent devenir résistantes à l'effet anti-prolifératif du TGF- $\beta$  et l'utiliser comme facteur de progression tumorale. Ces cellules ou leur microenvironnement peuvent alors surexprimer le TGF- $\beta$ . Le TGF- $\beta$  va alors agir à la fois sur l'environnement tumoral, ce qui va favoriser la

croissance de la tumeur et la formation de métastases, mais également sur les cellules tumorales elles-mêmes.

L'expression du TGF- $\beta$  est souvent corrélée avec la sévérité du cancer. Il a été montré que des niveaux élevés de TGF- $\beta$  sont en effet associés à de mauvais pronostics dans plusieurs cancers comme le cancer du sein ou du côlon (Derynck, Akhurst et al. 2001). Le TGF- $\beta$  favorise la cancérogenèse en régulant différentes fonctions biologiques.

### **II. B. 1. Rôle sur le système immunitaire**

Une des propriétés du TGF- $\beta$  est de permettre aux cellules tumorales d'échapper au système immunitaire. En effet, le TGF- $\beta$  va réprimer l'action du système immunitaire en inhibant la production, la prolifération et la fonction de la plupart des cellules du système immunitaire ; aussi bien les cellules du système immunitaire acquis, comme les lymphocytes T effecteurs (CTLs) ou helpers (Th1 ou Th2), que les cellules du système immunitaire inné comme les macrophages (Siegel and Massague 2003). Le rôle immunosuppresseur du TGF- $\beta$  va permettre aux métastases d'échapper à la surveillance immunitaire et ainsi favoriser la dissémination métastatique dans tout l'organisme.

### **II. B. 2. Rôle sur l'angiogenèse**

Le TGF- $\beta$  va également favoriser l'angiogenèse, nécessaire pour apporter l'oxygène et les nutriments aux cellules cancéreuses. En effet, il peut induire l'expression de facteurs angiogéniques tels que VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et CTGF (Connective-Tissue Growth Factor) dans les cellules épithéliales et fibroblastiques. Pour former des vaisseaux, les tumeurs doivent recruter des cellules endothéliales, notamment en induisant la dissolution de vaisseaux matures à proximité de la tumeur. Pour cela, le TGF- $\beta$  réprime l'expression de l'angiopoïétine 1 (ANG1), une protéine nécessaire au maintien de l'intégrité des vaisseaux et active la sécrétion et l'activation des MMP (Matrix Metallo Proteases), qui vont créer un environnement riche en protéases, propice à la libération de facteurs angiogéniques séquestrés dans la matrice extra-cellulaire (Siegel and Massague 2003).



### **II. B. 3. Rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)**

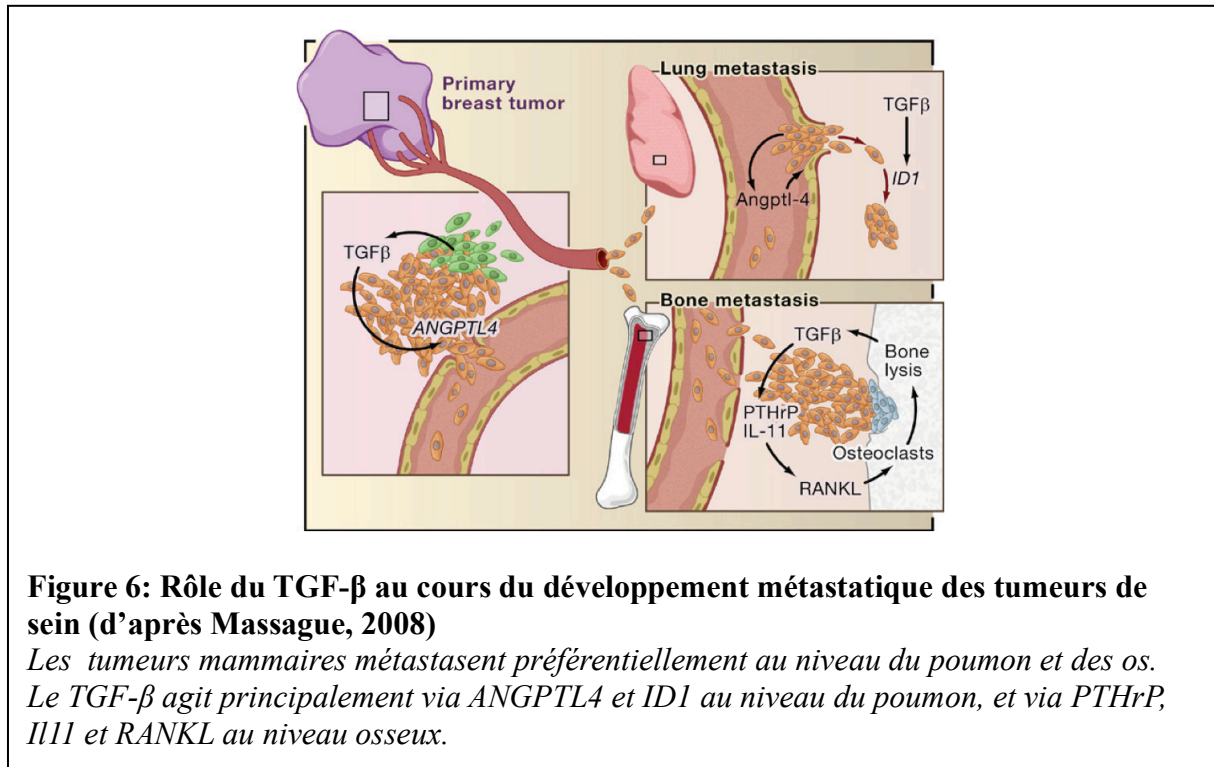
Le TGF- $\beta$  est également un promoteur de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La TEM permet aux cellules épithéliales de perdre leurs caractéristiques typiques de cellules épithéliales, telles que les jonctions cellule-cellule ou la polarité apicale, et d'acquérir des propriétés fibroblastiques comme la formation de fibres de stress d'actine consécutive à la réorganisation du cytosquelette, ou encore la synthèse de MMP, permettant aux cellules de dégrader la matrice extra-cellulaire et donc de migrer. La TEM est donc nécessaire pour que les cellules acquièrent des propriétés migratoires et invasives.

Il semble que la TEM induite par le TGF- $\beta$  soit le résultat de l'activation de plusieurs voies de signalisation, puisque des études ont montré que l'activation des protéines Smads, de la GTPase RhoA, des kinases p38 et Akt, et de la protéine de polarité Par6 étaient impliquées lors de ce processus (Bhowmick, Ghiassi et al. 2001, Yu, Hebert et al. 2002, Ozdamar, Bose et al. 2005). Le TGF- $\beta$  induit ainsi l'expression de plusieurs facteurs de transcription de la famille Snail/Slug, bHLH (Basic Helix-Loop-Helix) ou ZEB (Wu, Sato et al. 2012). Ces facteurs de transcription favorisent la TEM, en activant la transcription de gènes codant pour des marqueurs fibroblastiques (Vimentine, Fibronectine, etc...) et/ou en réprimant celle de gènes codant pour des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, ZO-1, etc...) (Katsuno, Lamouille et al. 2013).

### **II. B. 4. Rôle dans la formation des métastases**

Enfin, le TGF- $\beta$  peut aussi favoriser directement la formation de métastases. Le mécanisme par lequel le TGF- $\beta$  favorise la dissémination métastatique a été particulièrement bien étudié dans le cancer du sein (Kang, Siegel et al. 2003) (**Fig.6**). Les cancers mammaires métastasent principalement au niveau pulmonaire et osseux. Le TGF- $\beta$  va induire la protéine ANGPTL4 (Angiopoiétine-Like 4), qui va permettre la dissolution des jonctions endothéliales vasculaires et permettre aux cellules tumorales de passer dans la circulation sanguine. Cet événement va favoriser le développement de métastases pulmonaires. Au niveau du poumon, le TGF- $\beta$  va induire l'expression du gène *IDI* (Inhibitor of DNA binding 1), un inhibiteur notamment de la différenciation, qui va permettre la réinitiation de la tumeur. Au niveau osseux, le TGF- $\beta$  va induire l'expression de gènes comme *CTGF*, *IL11* et la sécrétion de PTHrP, qui vont notamment activer la protéine RANKL (Receptor Activator of NF-KappaB Ligand). RANKL entraîne la différenciation d'ostéoblastes en ostéoclastes, qui sont responsables de la

dégradation osseuse. L'homéostasie du tissu osseux répond à un équilibre entre la dégradation osseuse réalisée par les ostéoclastes et la formation osseuse régulée par les ostéoblastes. Le TGF- $\beta$  induit donc la différenciation d'ostéoblastes ce qui entraîne une forte dégradation osseuse (Massague 2008).



## II. C. Altérations de la signalisation TGF- $\beta$ dans les cancers

Plusieurs gènes codant pour des protéines de la signalisation TGF- $\beta$  ont été identifiés comme étant mutés, délétés, sous-exprimés ou surexprimés dans les cancers. *T $\beta$ RII* et *Smad4* sont le plus fréquemment inactivés, et sont considérés comme des suppresseurs de tumeurs.

Plus de 80% des cancers du côlon présentant un phénotype d'instabilité des microsatellites (MSI), qu'ils soient sporadiques ou héréditaires, (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer ou HNPCC), contiennent des mutations dans le gène *T $\beta$ RII*. Ces mutations se situent au niveau d'une région microsatellite de dix bases adénine, localisées sur l'exon 3 de *T $\beta$ RII* (Markowitz, Wang et al. 1995), et sont des insertions ou des délétions de une ou deux adénines, qui conduisent à la formation d'une protéine T $\beta$ RII tronquée de son domaine kinasique et transmembranaire, et donc inactive. Ces mutations sont aussi retrouvées dans des tumeurs gastriques et des gliomes à MSI. T $\beta$ RII peut être également muté dans son domaine

kinase, notamment dans des cancers du côlon non MSI et des cancers du sein (Myeroff, Parsons et al. 1995, Izumoto, Arita et al. 1997, Lucke, Philpott et al. 2001).

*Smad4* est un autre composant de la voie TGF- $\beta$  fréquemment inactivé, et particulièrement dans les cancers du pancréas, d'où son autre nom DPC (Deleted in Pancreatic Cancer) (Hahn, Schutte et al. 1996). En effet, *Smad4*, situé au bras 18q, présente une perte d'hétérozygotie (LOH) dans plus de 50% des cancers du pancréas. Dans 30% de ces cancers pancréatiques, *Smad4* subit une mutation homozygote et dans les 20% restants, il est inactivé par mutation du second allèle, faisant de *Smad4* un gène suppresseur de tumeur majeur dans ces cancers. Des mutations de *Smad4* ont également été identifiées dans d'autres cancers, par exemple dans 30% des cancers du côlon métastatiques. Ces mutations non sens ou de décalage du cadre de lecture se situent majoritairement dans son domaine MH2, et entraînent la formation de protéine ne pouvant pas se lier aux R-Smads et/ou instable (Miyaki and Kuroki 2003).

Des mutations ont également été trouvées dans *Smad2*, notamment dans les cancers colorectaux ou pulmonaires mais moins fréquemment que pour *Smad4* (Massague 2008). Ces mutations peuvent affecter la stabilité de ces protéines (Dumont, Lallemand et al. 2003). La plupart de ces mutations concourent à l'inhibition de la voie TGF- $\beta$  et donc à la perte de ses actions anti-prolifératives et pro-apoptotiques dans la cellule.

Les différentes altérations identifiées dans les composants de la signalisation TGF- $\beta$  n'expliquent pas la plupart des dérégulations de cette voie observées dans les cancers, suggérant que de nouvelles protéines impliquées dans la signalisation TGF- $\beta$  peuvent être la cible d'altérations durant le processus de cancérogenèse. Mon laboratoire a donc cherché à identifier de nouveaux acteurs de cette signalisation TGF- $\beta$ , qui pourrait être dérégulés dans les cancers. Dans ce contexte, il a identifié la E3 ubiquitine ligase WWP1 comme une protéine pouvant réguler la signalisation TGF- $\beta$  par ubiquitination de certains de ses composants.

## Chapitre 2: Ubiquitination

---

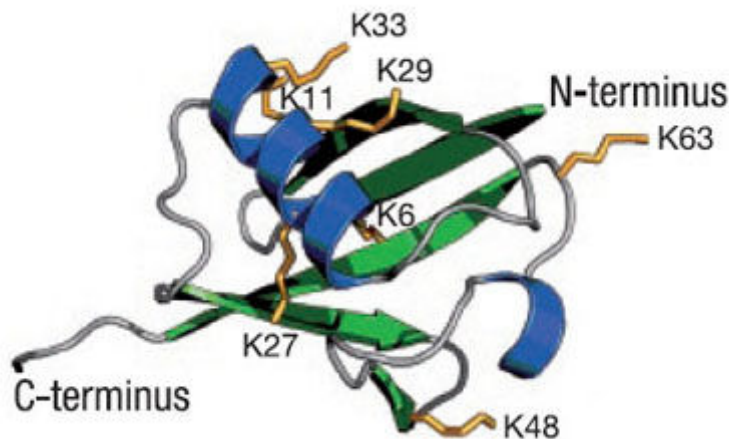
Après leur traduction, les protéines subissent des modifications post-traductionnelles qui peuvent moduler leur localisation, leur fonction ou leur activité et enrichissent ainsi la diversité fonctionnelle des protéines d'un organisme. Ces modifications sont variées et incluent par exemple l'ajout de groupement phosphate, acétyle ou méthyle sur des protéines. D'autres modifications résultent de la fixation covalente de protéines entières sur des protéines substrats. L'exemple le plus connu est l'ubiquitination qui consiste en la fixation covalente d'un ou plusieurs peptides d'ubiquitine sur des protéines intracellulaires. Ce mécanisme a été découvert à la fin des années 70 par les chercheurs Aaron Ciechanover, Avram Herschko, et Irwin Rose qui étudiaient la dégradation protéique induite par l'ubiquitine et leur a valu l'attribution du prix Nobel de chimie en 2004. Il est désormais établi que l'ubiquitination joue en fait un rôle clé sur la régulation de nombreux processus cellulaires en intervenant notamment sur la dégradation, la localisation cellulaire ou l'activité des protéines ubiquitinées.

### I. L'ubiquitine et les Ubls

Initialement isolée dans le thymus de veau, l'ubiquitine est en réalité présente dans tous les compartiments subcellulaires de toutes les cellules de l'organisme, son expression ubiquitaire lui ayant donnée son nom. L'ubiquitine est un peptide de 76 acides aminés d'environ 8,5 kDa, hautement conservé chez les eucaryotes mais absent chez les bactéries (Kerscher, Felberbaum et al. 2006). Chez l'Homme, les gènes codant pour l'ubiquitine sont appelés multi-gènes. En effet, l'ubiquitine est synthétisée sous forme de chaînes linéaires de plusieurs peptides ubiquitine à la suite, qui sont monomerisés ultérieurement (Wiborg, Pedersen et al. 1985).

Suite à l'ubiquitine, des petites protéines présentant des homologies structurales avec l'ubiquitine ont été découvertes et appelées Ubls (Ubiquitine Like proteins). Parmi ces protéines, on trouve notamment les peptides SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier), NEDD8, ISG15, HUB1, FAT10 ou encore URM1 (Welchman, Gordon et al. 2005). Bien que ces protéines n'aient pas de similarités avec l'ubiquitine au niveau de leurs séquences primaires, leurs structures tridimensionnelles sont très proches et composées de plusieurs feuillets- $\beta$  stabilisés par deux hélices  $\alpha$  (Hochstrasser 2000) (**Fig.7**). La conjugaison des Ubls

sur des protéines cibles s'effectue par un mécanisme semblable à celui utilisé pour l'ubiquitination. Cependant, les conséquences fonctionnelles de ces modifications sont différentes de celles de l'ubiquitination et restent pour la plupart indéterminées (Kerscher, Felberbaum et al. 2006).



**Figure 7 : Représentation de la structure tridimensionnelle de l'ubiquitine**

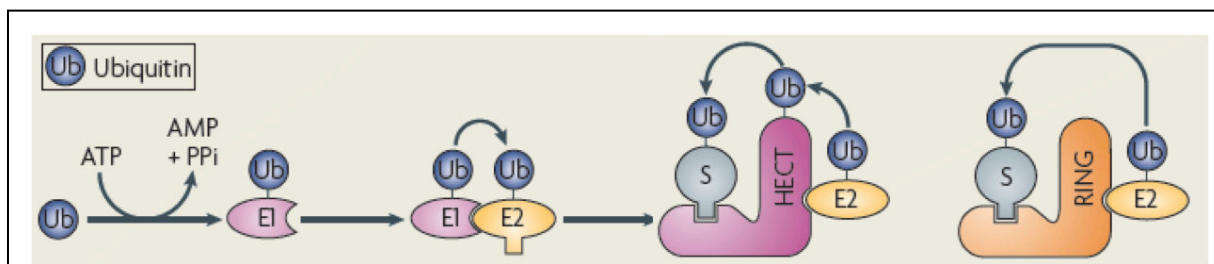
*Les hélices  $\alpha$  sont colorées en bleu, les feuillets  $\beta$  sont colorés en vert. Les chaînes latérales des résidus lysines sont colorées en orange. Cette image a été réalisée avec PyMol.*

## II. Réaction d'ubiquitination

La réaction d'ubiquitination consistant en l'activation de l'ubiquitine puis sa fixation au substrat s'opère grâce à l'action séquentielle de trois enzymes distinctes : une enzyme E1 d'activation, une enzyme E2 de conjugaison et une E3 ubiquitine ligase (Hershko and Ciechanover 1998) (Kerscher, Felberbaum et al. 2006) (**Fig.8**).

Lors de la première étape, l'enzyme E1 active l'ubiquitine en adénylant son extrémité C-terminale. En présence d'ATP, l'enzyme E1 forme une liaison thioester entre le résidu cystéine de son site catalytique et le résidu glycine de l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine (**Fig.9**). L'ubiquitine activée est ensuite transférée sur le résidu cystéine du site catalytique d'une enzyme E2 de conjugaison. Finalement, l'ubiquitine est transférée, grâce à une E3 ubiquitine ligase, au groupement  $\text{NH}_2\text{-}\epsilon$  d'un résidu lysine de son substrat. Une liaison covalente isopeptidique entre un résidu lysine du substrat et le résidu glycine de l'extrémité C-

terminale de l'ubiquitine est ainsi formée (Bedford, Layfield et al. 2011) (**Fig.8 et 9**). Il est à noter que si l'ubiquitine est majoritairement conjuguée sur des résidus lysines d'un substrat, elle peut aussi être fixée sur d'autres résidus, comme les résidus cystéines par exemple (Cadwell and Coscoy 2005). En effet, la E3 ubiquitine ligase virale MIR1 est capable d'ubiquitiner des molécules du complexe d'histocompatibilité de type I (MHC I) sur un résidu cystéine, et éventuellement un résidu serine. Cette ubiquitination conduit à l'endocytose et à la dégradation de ces molécules (Cadwell and Coscoy 2005).



**Figure 8 : Activation et transfert de l'ubiquitine des enzymes E1 à E3 (d'après Welchman et al, 2005)**

*La réaction d'ubiquitination est catalysée par trois enzymes qui agissent séquentiellement. Une enzyme E1 d'activation, une enzyme E2 de conjugaison et une E3 ligase qui permet le transfert de l'ubiquitine sur son substrat et qui est responsable de la spécificité de la réaction pour ce substrat .*

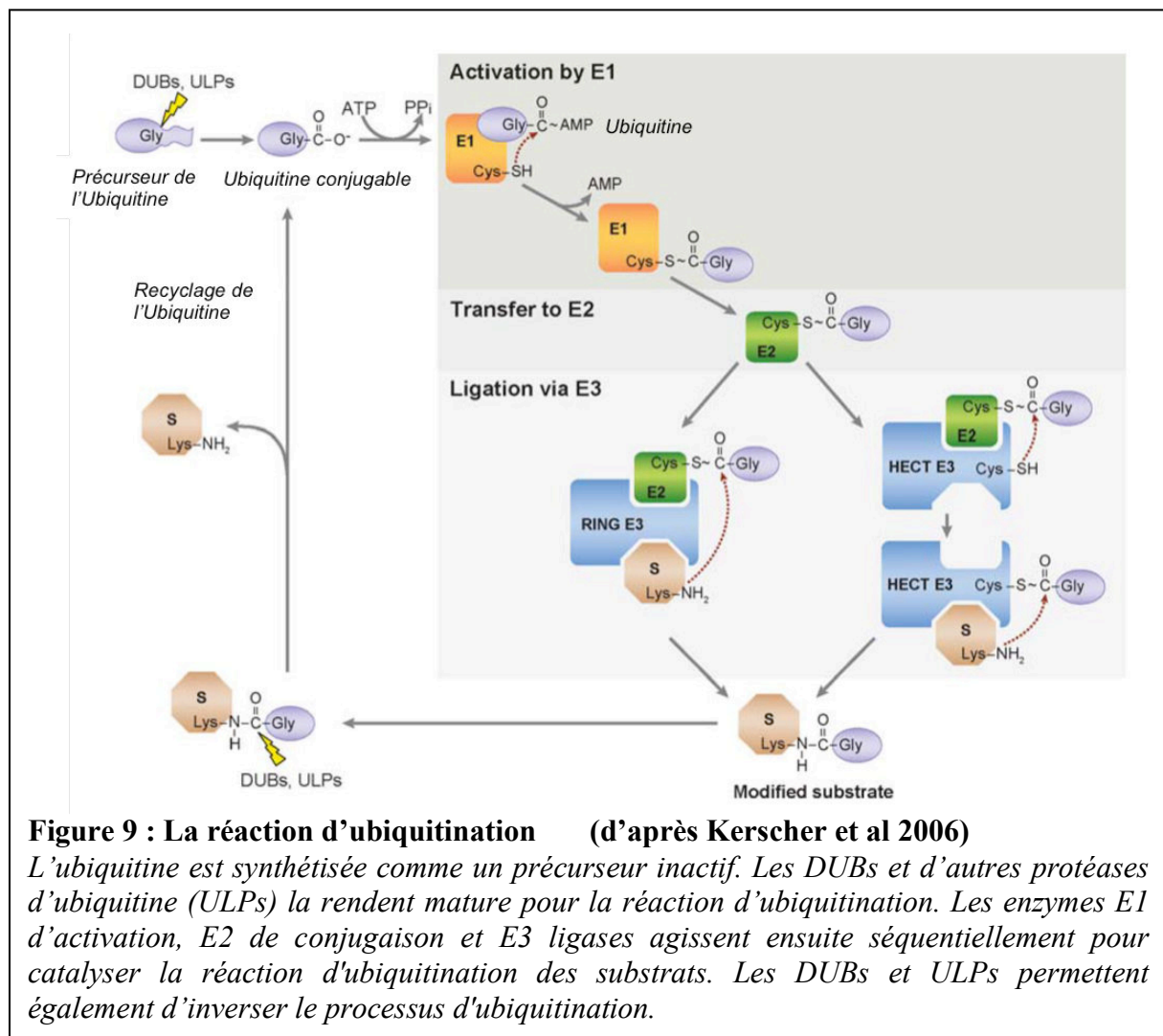
Pour ubiquitiner les protéines, les trois enzymes E1, E2 et E3 agissent de manière séquentielle. Il a ainsi été montré que l'enzyme E2 ne peut pas se lier aux enzymes E1 et E3 en même temps. Une fois que l'ubiquitine est transférée sur l'enzyme E2, l'enzyme E1 doit être libérée pour que la E2 puisse se lier à la E3 ligase. De plus, la liaison de l'ubiquitine aux différentes enzymes modifie l'affinité d'interaction de celles-ci entre elles. Ainsi, une enzyme E1 conjuguée à l'ubiquitine peut se lier à une E2 libre mais elle se dissocie d'une E2 liée à l'ubiquitine. De manière similaire, les E3 ligases libres ont plus d'affinités pour les E2 liées à l'ubiquitine que pour les E2 libres (Kawakami, Chiba et al. 2001, Siepmann, Bohnsack et al. 2003).

### III. Déubiquitination

Le processus d'ubiquitination est réversible grâce à l'action d'enzymes spécifiques, appelées DUB (DeUBiquiting enzymes) ou déubiquitinases (**Fig.9**). Le génome humain compte

environ 80 DUBs. Ces DUBs peuvent être classées en 5 familles selon leur domaine catalytique (USPs, UCHs, OTUs, Josephins and JAMMs). Les 4 premières familles sont des protéases à cystéine alors que les enzymes de la famille JAMM (JAB1/MPN/Mov34 Metalloprotease) sont des métallo-protéases (Komander, Clague et al. 2009).

Les DUBs présentent trois grands rôles dans la cellule. Tout d'abord, elles sont nécessaires à la synthèse de monomères d'ubiquitine. L'ubiquitine est en effet traduite en chaînes linéaires de plusieurs molécules, qui sont individualisées grâce à l'action de DUBs. Pour les peptides Ubl, les enzymes responsables de ce mécanisme sont les ULPs (Ubiquitin-Like Proteases). Deuxièmement, les DUBs peuvent dépolymériser les chaînes d'ubiquitines liées aux substrats, ainsi elles exercent un effet inverse aux E3 ligases, et recyclent le pool cellulaire de monomères d'ubiquitine libres. Enfin, les DUBs modulent également la modification post-traductionnelle des protéines en raccourcissant les chaînes d'ubiquitine fixées sur un substrat (Komander, Clague et al. 2009). Il est à noter que les DUBs peuvent être spécifiques d'un type de chaînes de polyubiquitine. Par exemple, AMSH (Associated Molecule with the SH3-domain of STAM), une DUB de la famille JAMM semble déubiquitiner préférentiellement des chaînes d'ubiquitine K63 (**cf. Chapitre 2/ IV. C.**) mais est incapable de déubiquitiner le peptide ubiquitine fixé directement au substrat (Komander, Clague et al. 2009). Celui-ci devra donc être déubiquitiné par d'autres DUBs.



## IV. Différents types d'ubiquitination

Les protéines cibles peuvent être monoubiquitinées, multi-monoubiquitinées ou polyubiquitinées.

### IV. A. La monoubiquitination et la multi-monoubiquitination

La monoubiquitination consiste en la conjugaison d'une seule molécule d'ubiquitine sur un résidu lysine d'un substrat, alors que la multi-monoubiquitination consiste en la conjugaison



d'une seule molécule d'ubiquitine sur plusieurs de ses résidus lysines.

La monoubiquitination est impliquée dans des fonctions très variées comme la réparation de l'ADN, le remodelage de la chromatine ou l'endocytose. Par exemple, la E3 ligase Rad18 monoubiquitine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) après altération de l'ADN, PCNA monoubiquitiné va alors être polyubiquitiné par d'autres E3 ligases pour initier la réparation de l'ADN (Hibbert, Huang et al. 2011). La monoubiquitination des histones H2A et H2B permet, elle, le remodelage de la chromatine, et est notamment nécessaire à l'ouverture de la chromatine (Cao and Yan 2012). Il a également été montré que la monoubiquitination de récepteurs, tel que le récepteur à l'urée UT-A1, induit son internalisation et sa dégradation par la voie lysosomale (Haglund, Sigismund et al. 2003, Sun, Guo et al. 2011). Bien que la monoubiquitination ait été montrée comme suffisante pour l'endocytose de récepteurs, certains récepteurs tyrosine kinases (RTKs) comme l'EGFR peuvent aussi être endocytés après avoir été multi-monoubiquitinés (Haglund, Sigismund et al. 2003).

#### **IV. B. La polyubiquitination**

Quant à la polyubiquitination, il s'agit de la fixation sur le substrat d'une chaîne égale ou supérieure à quatre molécules d'ubiquitine liées entre elles. Dans ce dernier cas, un résidu lysine de l'ubiquitine conjuguée au substrat est utilisé comme accepteur d'ubiquitine. L'ubiquitine contient 7 résidus lysines (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 et Lys63) (**Fig.7**) et les chaînes d'ubiquitination peuvent être formées sur une ou plusieurs de ces lysines, les plus décrites étant les chaînes sur Lys48 et Lys63 (**Fig.10**). Le type d'ubiquitination et la nature des chaînes formées déterminent le devenir des substrats.

#### **IV. C. Différentes chaînes d'ubiquitine**

La variété des fonctions biologiques déclenchées par le signal d'ubiquitination s'explique notamment par la diversité des chaînes d'ubiquitination générées (**Fig.10**).

♦ La polyubiquitination par des chaînes d'ubiquitine liées en Lys48 (chaînes K48) est le type d'ubiquitination le plus répandu. Elle a pour principale conséquence la dégradation des protéines par le protéasome 26S (Pickart 1997). Le protéasome 26S est un multi-complexe de 2,5 MDa, composé d'un sous-complexe, le protéasome 20S, qui possède l'activité catalytique

et un ou deux autres sous-complexes identiques, le protéasome 19S, capables de lier les protéines polyubiquitinées. Ainsi, les composants du complexe protéasome 19S, notamment les protéines Rpn1 et Rpn2, reconnaissent le substrat, le lient et le déplient pour l'envoyer au complexe 20S, où les chaînes d'ubiquitine sont dépolymérisées et recyclées, et les protéines dégradées (Inobe and Matouschek 2014). Il est maintenant bien décrit que les composants du protéasome et ses protéines adaptatrices se lient de préférence les chaînes d'ubiquitine K48 et donc les substrats sur lesquels ces chaînes sont fixées (Young, Deveraux et al. 1998, Elsasser, Gali et al. 2002). Plus rarement, d'autres conséquences que la dégradation par le protéasome ont été identifiées pour les protéines polyubiquitinées par des chaînes K48. Ainsi, lors de cassures double-brin de l'ADN (DSBs ou Double-Strand Breaks), il a été montré que la E3 ligase RNF8 induit la polyubiquitination par des chaînes K48 de substrats au niveau des DSBs. Ceux-ci sont alors reconnus par le complexe de protéines p97-UFD1-NPL4, qui possède des motifs de liaison à l'ubiquitine spécifiques des chaînes K48. Ce complexe est ainsi recruté au niveau des DSBs, où il peut activer la réparation de l'ADN, en régulant notamment RAD51 (Meerang, Ritz et al. 2011). Les chaînes K48 peuvent donc avoir un rôle de reconnaissance par d'autres protéines, sans obligatoirement envoyer la protéine substrat au protéasome.

◆ Les chaînes K63 ont généralement des conséquences autres que la dégradation par le protéasome et peuvent intervenir dans des fonctions très variées, comme par exemple la réparation de l'ADN, la transduction du signal, l'endocytose ou la dégradation des protéines par le lysosome (Passmore and Barford 2004).

La polyubiquitination des histones H2A et H2AX en K63 par la E3 ubiquitine ligase RNF8 est par exemple cruciale pour le recrutement de complexes de réparation à l'ADN, tel que BRCA1 (Breast Cancer 1) (Yan and Jetten 2008). Les chaînes K63 jouent également un rôle capital dans l'endocytose des protéines et leur dégradation par la voie des lysosomes. Les lysosomes sont des organites présents dans le cytoplasme, contenant notamment des protéases capables de digérer le contenu d'endosomes ou de phago-endosomes avec lesquels ils fusionnent. Pour que les protéines soient dégradées par cette voie, il faut donc qu'elles soient endocytées (c'est le cas par exemple pour les récepteurs membranaires) ou inclus dans un phagosome (Ciechanover 2005). Il a par exemple été montré que la E3 ligase virale K3 entraîne la polyubiquitination des molécules MHC de classe I en K63. La protéine adaptatrice d'internalisation Epsin1, qui possède des domaines de liaison à l'ubiquitine UIM (Ubiquitin Interacting Motif) (cf. **Chapitre 2/ V.**) ayant une affinité accrue avec les chaînes d'ubiquitine

K63, va ainsi reconnaître les molécules MHC de classe I polyubiquitinées en K63 et induire leur endocytose et leur dégradation (Duncan, Piper et al. 2006). Il a été montré que le récepteur à l'EGFR était aussi dégradé par cette voie grâce à sa polyubiquitination en K63 (Huang, Kirkpatrick et al. 2006). Ces dégradations de protéines sont donc dépendantes de protéines responsables de l'endocytose, telles que les protéines Epsin1 ou Eps15, qui possèdent des domaines de liaison à l'ubiquitine UIM ayant une affinité particulière avec les chaînes K63 (Tanno and Komada 2013). Néanmoins, il a été montré que d'autres types d'ubiquitination, incluant la monoubiquitination et la polyubiquitination par des chaînes K11 sont aussi impliquées dans la dégradation lysosomale de protéines (Xu, Duong et al. 2009).

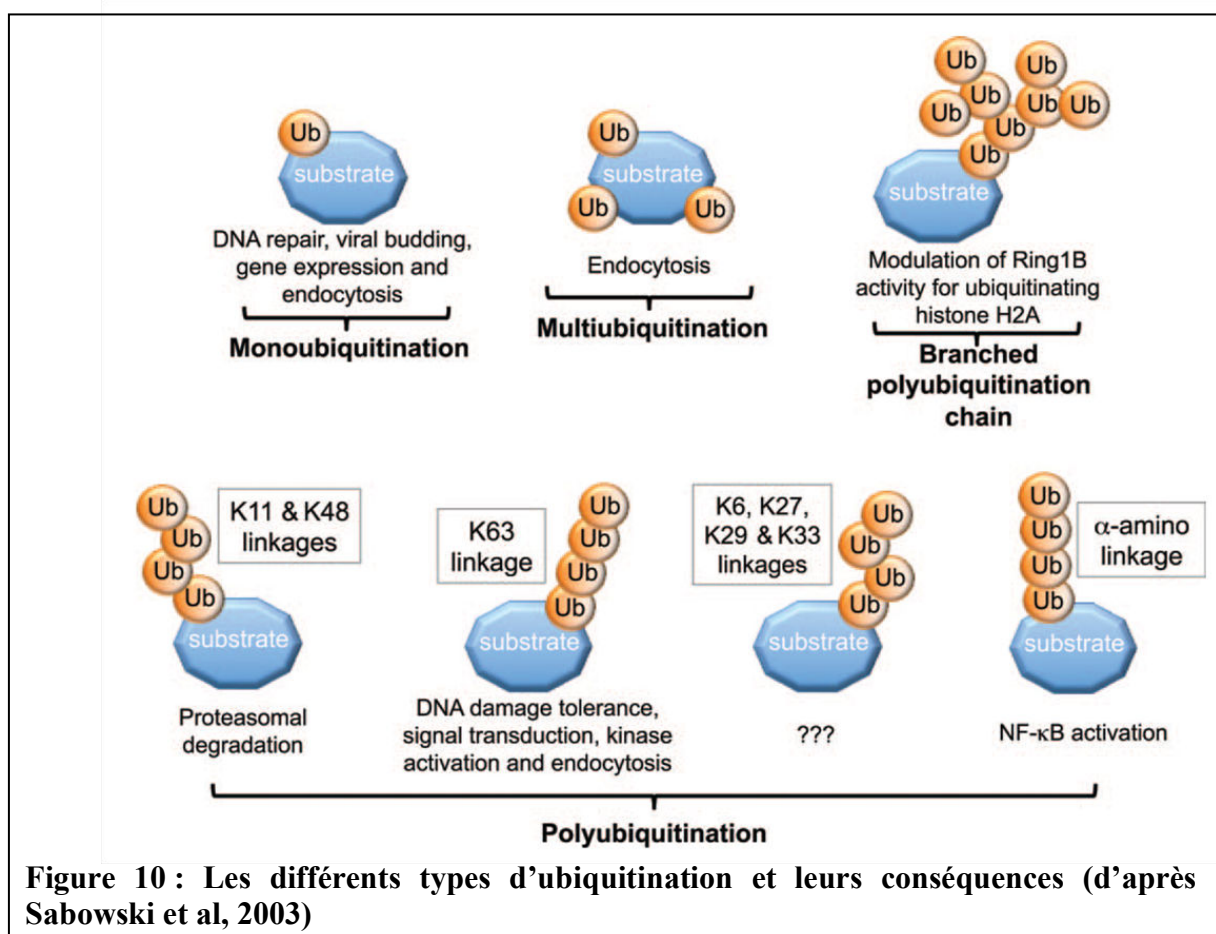
◆ Les chaînes K11 ont également été décrites comme étant impliquées dans la dégradation de protéines impliquées dans le cycle cellulaire (Jin, Williamson et al. 2008). En effet, la E3 ligase APC/C (Anaphase Promoting Complex) contrôle la progression au cours du cycle cellulaire en polyubiquitinant en K11 plusieurs protéines du cycle cellulaire, telles que la cycline B1 ou E2F1, ce qui conduit à leur dégradation par le protéasome (Budhavarapu, White et al. 2012).

◆ D'autres types de chaînes de polyubiquitine en K6, K27, K29 ou K33 ont été décrites mais leur rôle reste à ce jour peu ou pas connu (Sadowski, Suryadinata et al. 2012).

◆ Il faut également noter l'existence de chaînes mixtes de polyubiquitine. Dans ce type d'ubiquitination, des protéines sont modifiées par des chaînes de polyubiquitine où les peptides d'ubiquitine se fixent entre eux sur plusieurs résidus lysines différents. Ces chaînes sont appelées mixtes ou branchées. Par exemple, la E3 ligase Ring1B catalyse sa propre polyubiquitination par des chaînes d'ubiquitine mixtes sur des résidus lysines K6, K27 et K48. Cette polyubiquitination en chaîne mixte est nécessaire à son activité ligase, elle lui permet notamment de monoubiquitiner les histones H2A (Ben-Saadon, Zaaroor et al. 2006).

◆ Enfin, plus récemment, un autre type d'ubiquitination a été découvert. Il s'agit de la formation de chaînes d'ubiquitine linéaires, dans laquelle les chaînes d'ubiquitine sont fixées entre le résidu méthionine N-terminal d'une molécule d'ubiquitine et le résidu glycine C-terminal d'une autre molécule d'ubiquitine (Walczak, Iwai et al. 2012). Ces chaînes linéaires d'ubiquitine sont générées par le complexe E3 ubiquitine ligase LUBAC (Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex), composé de 3 protéines, HOIL-1 (Heme-Oxidized IRP2 ubiquitin Ligase-1), HOIP (HOIL Interacting Protein) et SHARPIN (Shank Associated RH Domain

Interacting Protein). Ce complexe permet d'inhiber l'apoptose induite par TNF- $\alpha$  en activant NF $\kappa$ B. En effet, après stimulation au TNF- $\alpha$ , LUBAC conjugue des chaînes d'ubiquitine linéaires à NEMO, la sous-unité régulatrice d'IKK, et induit son activation (Haas, Emmerich et al. 2009).



**Figure 10 : Les différents types d'ubiquitination et leurs conséquences (d'après Sabowski et al, 2003)**

## V. Les domaines de liaison à l'ubiquitine ou UBD

L'ubiquitine et les chaînes d'ubiquitine conjuguées à des protéines sont reconnues par des domaines de liaison spécifiques à l'ubiquitine, appelés UBD (Ubiquitin Binding Domain). La reconnaissance de l'ubiquitine par les UBDs constitue une étape essentielle dans la transduction de l'effet biologique induit par le signal ubiquitine. Ces domaines sont nombreux et participent ainsi à la diversité des réponses déclenchées par l'ubiquitination.

Les domaines UBDs sont répartis en 9 familles. Les familles UIM (Ubiquitin Interacting Motif) et UBA (Ubiquitin-Associated) comprennent la majorité des UBDs

(Fig.11). Les UBDs présentent la particularité de tous se lier de manière non covalente à l'ubiquitine. Les UBDs interagissent principalement au niveau d'une région hydrophobe, située autour du résidu Ile44 à la surface de l'ubiquitine globulaire. Les UBDs peuvent se lier à des monomères d'ubiquitine liés aux substrats ou les différents types de chaînes de polyubiquitine. Il semble que certains UBDs se lient préférentiellement à certains types de chaînes de polyubiquitine.

Un domaine UIM a ainsi été identifié dans la sous-unité S5a/Rpn10 du protéasome 19S. Il s'agit d'un motif d'une vingtaine d'acides aminés qui permet à la sous-unité régulatrice du protéasome de reconnaître les substrats polyubiquitinés par des chaînes K48 et de les dégrader (Deveraux, Ustrell et al. 1994). Un autre exemple est celui de la protéine RAP80 (Receptor Associated Protein 80) qui, en association avec BCRA1, participe à l'assemblage des complexes de réparation à l'ADN. Grâce à ses deux domaines UIM en tandem, RAP80 reconnaît spécifiquement les chaînes K63 conjuguées aux histones H2A et H2AX et se positionne ainsi aux foci d'ADN endommagés (Yan and Jetten 2008).

Domaines	Nombre de protéines	Taille (acides aminés)
CUE	<i>S. cerevisiae</i> 7 <i>H. sapiens</i> 21	42-43
GATII	<i>S. cerevisiae</i> 2 <i>H. sapiens</i> 14	135
GLUE	<i>S. cerevisiae</i> ? <i>H. sapiens</i> ?	~135
NZF (subset of ZnF-RBZ with a Thr-Phe motif)	<i>S. cerevisiae</i> 1 <i>H. sapiens</i> 25	~35
PAZ (ZnF-UBP)	<i>S. cerevisiae</i> 5 <i>H. sapiens</i> 16	~58
UBA	<i>S. cerevisiae</i> 10 <i>H. sapiens</i> 98	45-55
UEV (subset of UBCc without the catalytic Cys residue)	<i>S. cerevisiae</i> 2 <i>H. sapiens</i> ?	~145
UIM	<i>S. cerevisiae</i> 8 <i>H. sapiens</i> 71	~20
VHS	<i>S. cerevisiae</i> 4 <i>H. sapiens</i> 28	150

**Figure 11 : Les différents domaines UBDs (d'après Hicke et al, 2005)**

Les domaines UBDs sont répartis en 9 groupes. Les domaines UBA et UIM composent la majorité des ces UBDs.

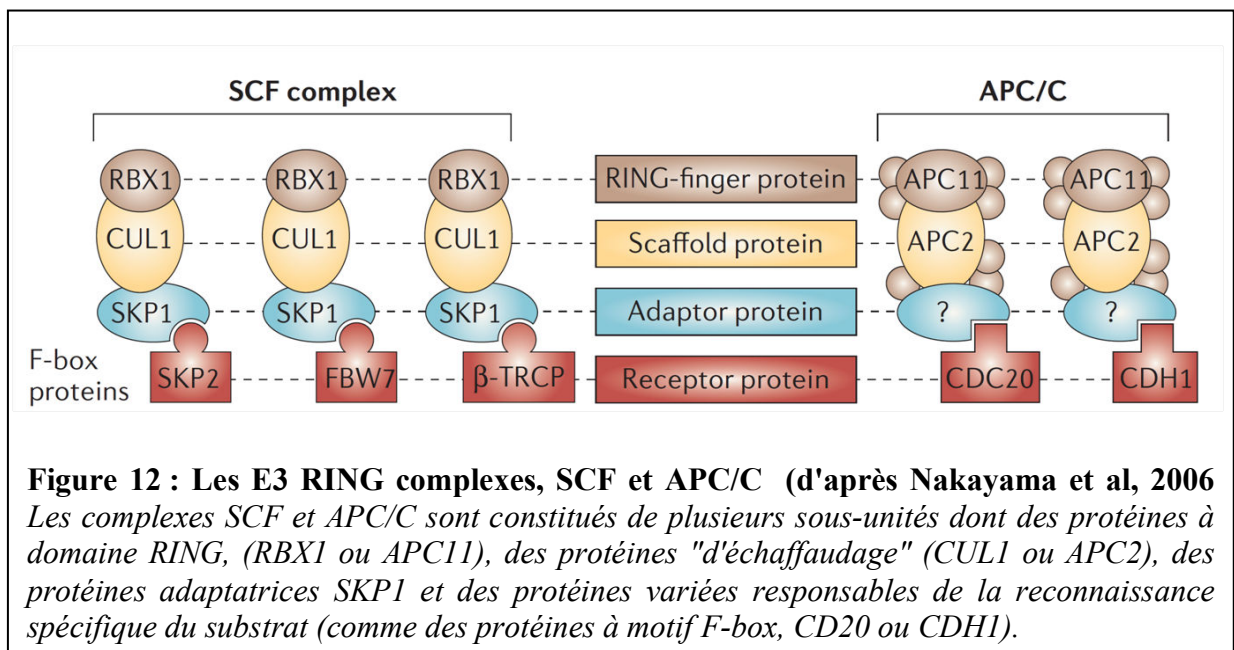
## **VI. Les E3 ubiquitine ligases**

Les E3 ubiquitine ligases sont responsables de la spécificité de la réaction d'ubiquitination pour un substrat donné. En effet, s'il n'existe que deux enzymes E1 et une trentaine d'enzymes E2 chez les mammifères, plus de six cents E3 ubiquitine ligases, spécifiques d'un ou de plusieurs substrats, ont été mises en évidence. Ces E3 sont principalement classées en deux familles qui se différencient par leur domaine catalytique: la famille des E3 à domaine HECT (Homologous to E6-associated protein C-Terminus) et celle des E3 à domaine RING (Really Interesting New Gene). Ces deux familles de E3 se distinguent par leur mécanisme permettant la conjugaison de l'ubiquitine sur le substrat.

### **VI. A. Les E3 ligases RING**

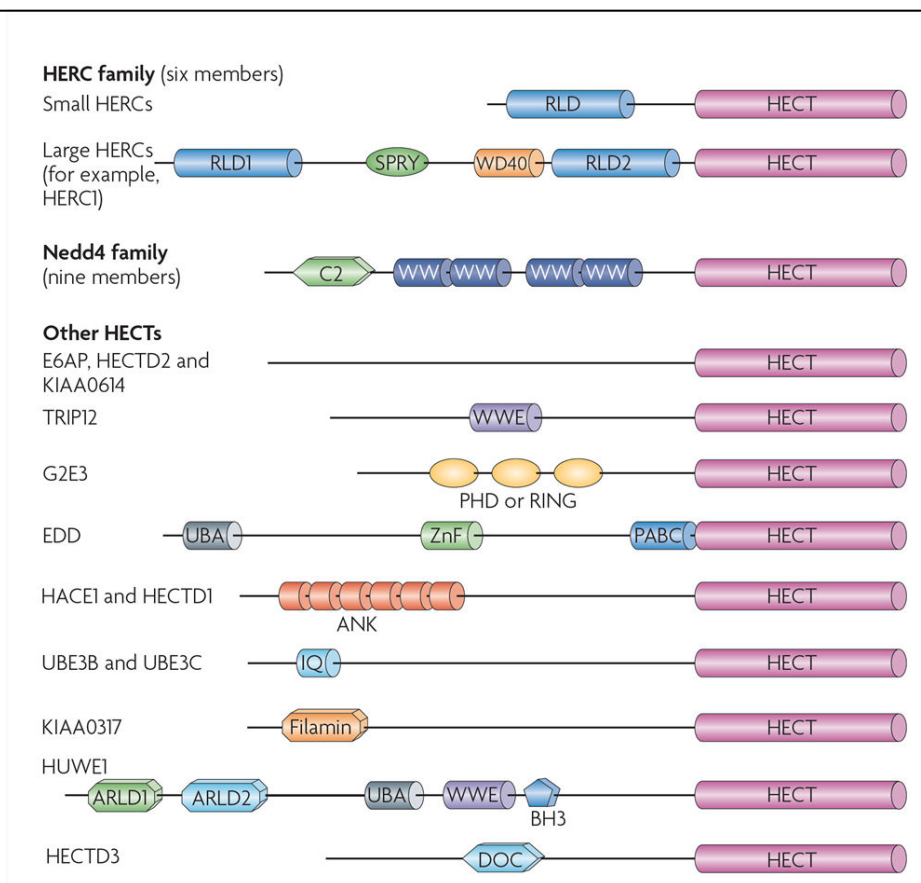
La famille des E3 à domaine catalytique RING représente 95% des E3 ligases chez l'Homme. Ces enzymes possèdent toutes un domaine catalytique RING constitué d'une structure globulaire et rigide de type « doigt de zinc » qui est coordonnée par deux ions Zinc autour de résidus cystéines et histidines conservés. Les E3 ligases RING peuvent agir sous forme de monomères, d'homo-dimères ou d'hétéro-dimères. La dimérisation des E3 RING se réalise le plus souvent au niveau de la structure « doigt de zinc ». Les E3 RING peuvent aussi former des complexes de multiples sous-unités : ce sont les CRL (Cullin RING Ligases) (Petroski and Deshaies 2005). Parmi ces CRL, les sous-familles APC/C (Anaphase Promoting Complexe/Cyclosome) et SCF (Skp1- Cullin1-F-box protein) jouent un rôle majeur dans la régulation du cycle cellulaire (**Fig.12**).

La caractéristique majeure des E3 ligases RING est qu'elles fonctionnent comme des adaptateurs qui positionnent l'enzyme E2 à proximité de son substrat et facilitent ainsi le transfert de l'ubiquitine directement sur le substrat (**Fig. 9**). Il semble également que le domaine « en doigt de zinc » des E3 ligases RING puisse modifier la conformation de l'enzyme E2 et ainsi activer son activité enzymatique (Ozkan, Yu et al. 2005).



## VI. B. Les E3 ligases HECT

La famille des E3 à domaine HECT comporte 28 membres connus chez l'Homme (**Fig.13**). Les E3 ubiquitine ligases HECT possèdent toutes un domaine catalytique HECT de 350 acides aminés situé à leur extrémité C-terminale et responsable de l'interaction avec les enzymes E2. Les E3 ligases HECT sont divisées en 3 grands groupes suivant la structure de leur domaine N-terminal : la famille HERC, la famille Nedd4, et les autres HECT (**Fig.13**) (Rotin and Kumar 2009).



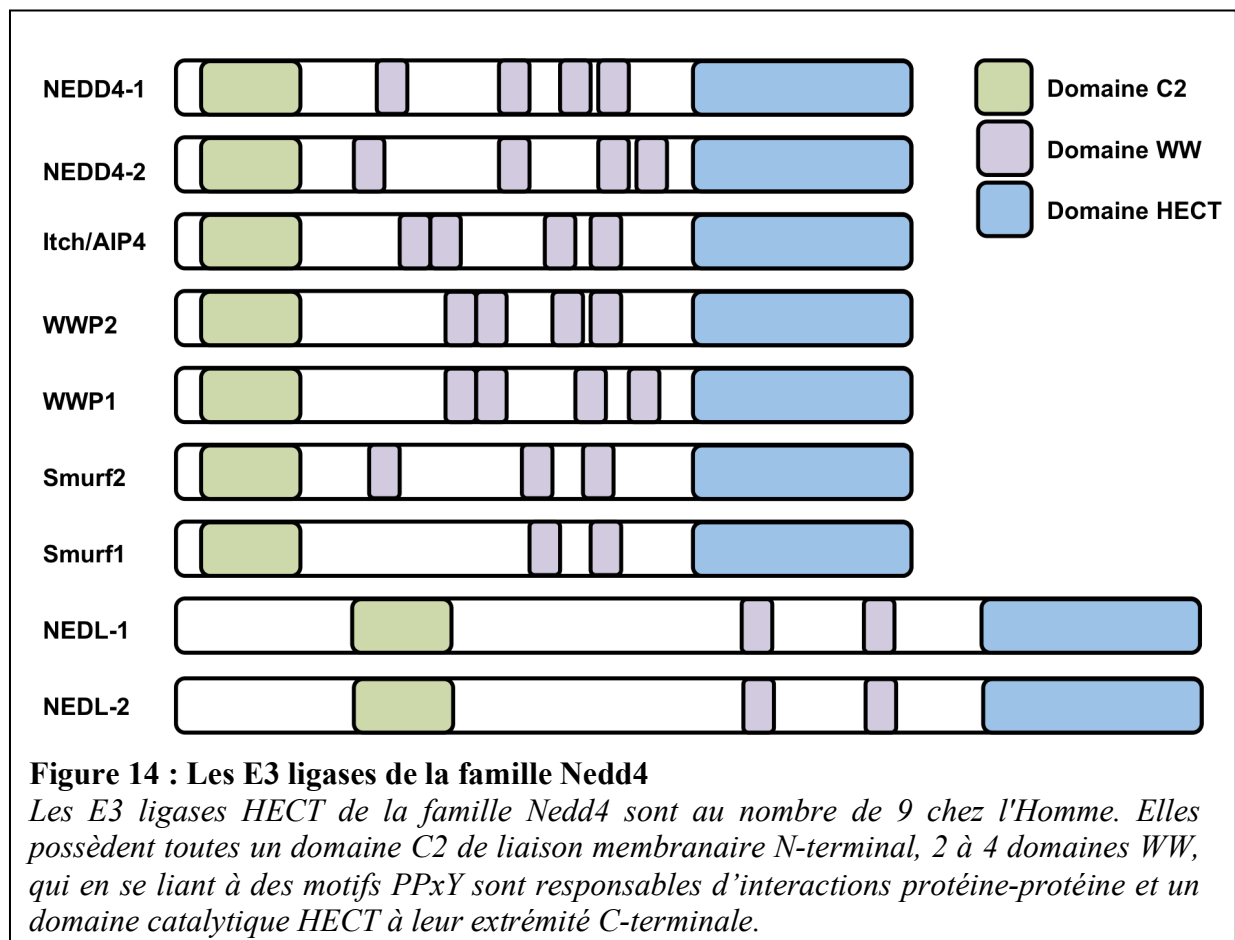
**Figure 13 : La famille des E3 ligases HECT (d'après Rotin et al, 2009)**

*Les E3 ligases de la famille HECT sont divisées en 3 groupes. Les E3 ligases HERC à domaines RLD, les E3 HECT à domaines WW de la famille Nedd4 et les autres E3 ligases ne contenant aucun de ces deux domaines.*

Les E3 ligases HECT de la famille HERC (HECT and RCC1 domain protein) possèdent un (pour les petites HERC) ou plusieurs (pour les grandes HERC, d'un poids moléculaire supérieur à 500kDa) domaines RLDs (Regulator of Chromosome Condensation 1 Like Domain) (**Fig13**). Le domaine RLD possède une région de liaison à la chromatine et une région qui comporte une activité GEF pour la protéine Ran (Rotin and Kumar 2009).

Les E3 ligases HECT de la famille Nedd4 possèdent toutes un domaine C2 de liaison aux phospholipides et deux à quatre domaines WW (**cf. Chapitre 3/ I.**) de liaison à des séquences peptidiques PPxY (Ingham, Colwill et al. 2005) (**Fig.14**). WWP1/Tiul1 appartient à cette sous-famille des E3 ligases de la famille Nedd4 (**cf. Chapitre 3**).

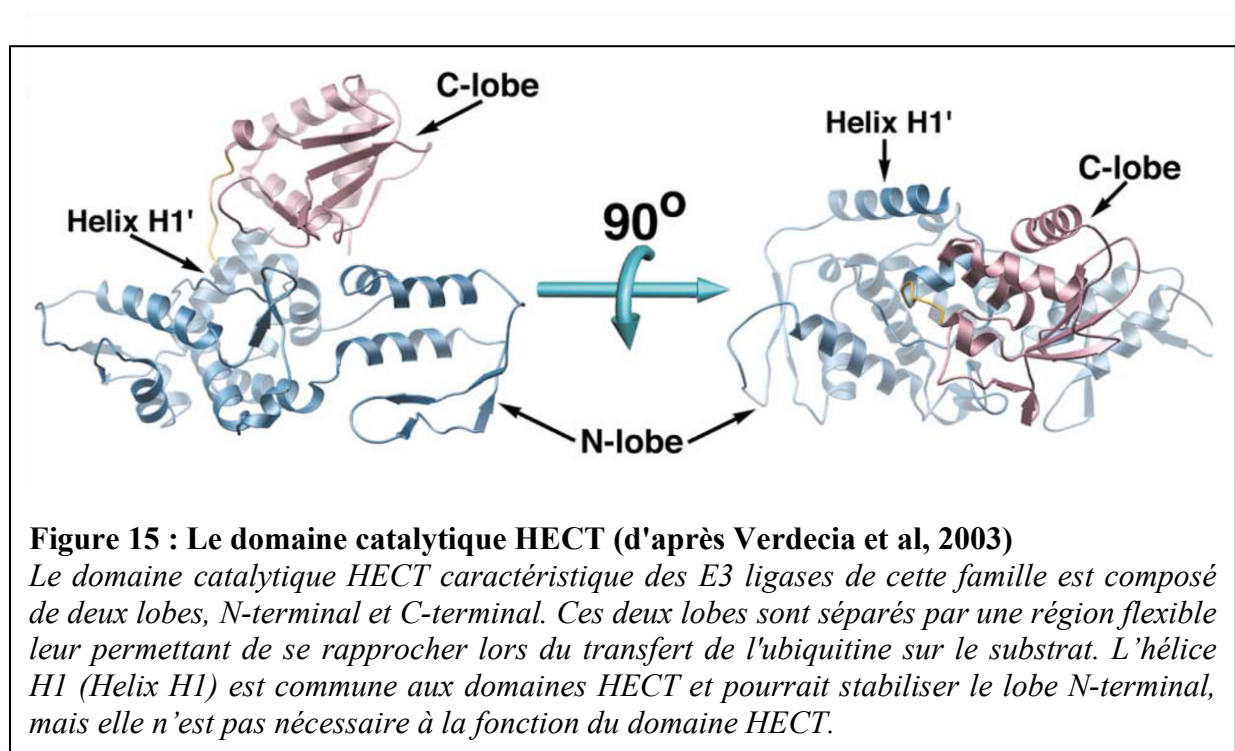




Le dernier groupe des E3 ligases HECT est composé des enzymes ne possédant ni domaine RLD ni domaine WW mais ayant une variété de domaines différents parmi lesquels des domaines de liaison à l'ubiquitine UBA (**cf. Chapitre 2/ V.**) ou des domaines en « doigt de Zinc » (**Fig.13**).

Contrairement à la famille des E3 ligases RING, les E3 ligases HECT transfèrent d'abord l'ubiquitine fixée à l'enzyme E2 vers le résidu cystéine de leur propre site catalytique, formant ainsi un pont thioester avec le résidu glycine de l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine. L'ubiquitine est ensuite transférée sur un résidu lysine du substrat (Welchman, Gordon et al. 2005) (**Fig.9**). La structure tridimensionnelle du domaine catalytique HECT de sept E3 ubiquitine ligases a été résolue (Verdecia, Joazeiro et al. 2003, Ogunjimi, Briant et al. 2005, Rotin and Kumar 2009). Le domaine catalytique HECT s'articule autour de deux lobes, un lobe N-terminal qui interagit avec l'enzyme E2 et un lobe C-terminal où se trouve le résidu cystéine accepteur de l'ubiquitine. Ces deux lobes sont liés par une région flexible leur permettant de se rapprocher lors de la réaction d'ubiquitination

pour faciliter le transfert de l'ubiquitine sur la protéine substrat (Ogunjimi, Briant et al. 2005) (**Fig.15**). En effet, la distance entre le résidu cystéine du site catalytique d'une E2, qui n'a pas fixé d'ubiquitine, et le résidu cystéine du site catalytique du domaine HECT d'une E3 est plus élevée que lorsque la même E2 a fixée l'ubiquitine. C'est ce rapprochement qui permet le transfert de l'ubiquitine de la E2 au lobe C-terminal du domaine HECT de la E3, puis sur le substrat. Le complexe entre les enzymes E2 et les enzymes E3 de la famille HECT est donc dépendant de la fixation d'ubiquitine par l'enzyme E2.



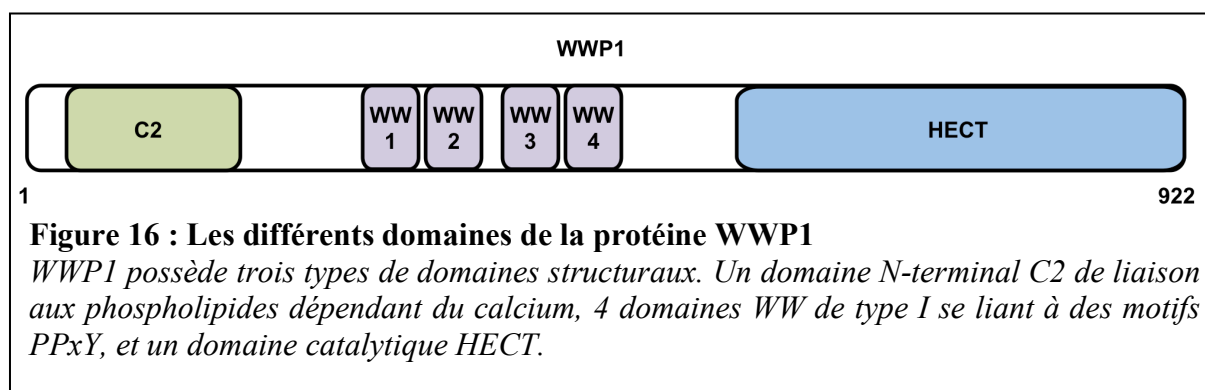
Durant mon projet de thèse, je me suis intéressé à la E3 ubiquitine ligase WWP1, une E3 ligase de la famille HECT. En effet, WWP1 est souvent surexprimée dans les cancers et mon laboratoire et d'autres ont découvert que WWP1 pouvait réguler la signalisation TGF- $\beta$ .

## Chapitre 3 : La E3 ubiquitine ligase WWP1

La protéine WWP1, aussi appelée Tiul1 (TGIF Interacting Ubiquitin Ligase 1) ou AIP5 (Atropin 1-Interacting Protein 5) est une protéine de 922 acides aminés et d'environ 110kDa. WWP1 a été identifiée en 1997 par Pirozzi et ses collaborateurs (Pirozzi, McConnell et al. 1997) lors d'un crible d'une banque de cDNA dont le but était d'identifier de nouvelles protéines possédant un domaine de type WW.

### I. Structure

D'un point de vue structural, WWP1 contient trois types de domaines : un domaine N-terminal C2, 4 domaines WW et un domaine C-terminal HECT (**Fig.16**). Les E3 ligases de la famille Nedd4 possèdent toutes cette structure « C2-WW-HECT » caractéristique et se différencient seulement par leur nombre de domaines WW, de deux à quatre. Ces trois types de domaines structuraux sont bien caractérisés.



#### I. A. Le domaine C2

Le domaine N-terminal C2 est un domaine de liaison aux phospholipides dépendant du calcium. Il permet notamment l'adressage des protéines aux membranes plasmiques et aux endosomes (Corbalan-Garcia and Gomez-Fernandez 2014). Ce domaine peut aussi être un domaine d'interaction avec des protéines, c'est notamment le cas pour certaines protéines de la famille Nedd4 (Plant, Lafont et al. 2000).

## **I. B. Les domaines WW**

Les domaines WW sont de courts modules d'une quarantaine d'acides aminés qui sont responsables de liaison protéines-protéines. Ils sont appelés ainsi car ils possèdent deux résidus tryptophanes (W) conservés, éloignés d'une vingtaine d'acides aminés. Ces domaines WW sont répartis en 4 groupes selon les séquences auxquelles ils se fixent, toutes riches en résidus prolines. Les 4 domaines de WWP1 appartiennent au premier groupe de domaine WW qui se lie à des motifs PPxY (Sudol and Hunter 2000). Les trois autres groupes de domaines WW se lient également à des séquences peptidiques riches en proline (P), respectivement à des motifs PPLP, PPR et (pT ou pS)-P (ou p représente la phosphorylation des résidus).

## **I. C. Le domaine catalytique Hect**

Enfin, le domaine HECT est le domaine catalytique de la E3 ligase WWP1. Il porte une activité enzymatique intrinsèque qui permet à WWP1 de transférer directement l'ubiquitine à son substrat grâce à son association avec les enzymes E2 UbcH5 et UbcH7 (Verdecia, Joazeiro et al. 2003). Le résidu responsable du transfert de l'ubiquitine de WWP1 à son substrat a été identifié, il s'agit du résidu cystéine C890 (Seo, Lallemand et al. 2004). La mutation de ce résidu entraîne la perte de l'activité catalytique de WWP1.

La structure 3D du domaine HECT de WWP1 a été résolue. Le domaine HECT est composé de deux lobes, un lobe C-terminal contenant les résidus responsables de l'activité catalytique de WWP1, et un lobe N-terminal, responsable de l'interaction avec l'enzyme E2. La région charnière reliant les 2 lobes, appelée boucle, est essentielle pour l'activité catalytique de WWP1. En effet, la rotation du lobe C-terminal autour de l'axe polypeptidique reliant les 2 lobes permet au domaine HECT de WWP1 de fixer l'ubiquitine provenant de l'enzyme E2 pour ensuite la transférer au substrat (Verdecia, Joazeiro et al. 2003) (**Chapitre 2/ VI. B.**).

## **II. Expression génique**

Le gène *WWP1* est localisé sur le chromosome 8q21, qui est une région souvent amplifiée dans les cancers, notamment les cancers du sein et de la prostate. Du reste, une amplification génique de *WWP1* a été identifiée dans environ 30% des cancers du sein et de la prostate (Chen, Sun et al. 2007, Chen, Zhou et al. 2007). *WWP1* est d'ailleurs actuellement décrit

comme un oncogène potentiel (**cf. Chapitre 3/ V. C**).

Il a été montré que le gène *WWP1* pouvait générer six isoformes par épissage alternatif dans la lignée cancéreuse mammaire T47D, mais la fonction de ces isoformes n'est pas actuellement connue (Flasza, Gorman et al. 2002).

L'expression de *WWP1* peut être régulée par le TGF- $\beta$ . Il a été par exemple montré que l'expression de l'ARNm de WWP1 est induite par le TGF- $\beta$  dans les lignées cellulaires de kératinocytes HaCaT et prostatique PC3 (Chen and Matesic 2007). Il existe une boucle de rétrocontrôle négatif entre la WWP1 et la signalisation TGF- $\beta$ , puisque WWP1 est un régulateur négatif de la transduction des effets du TGF- $\beta$  (**cf. Chapitre 3/ IV. A**).

### III. Localisation

La protéine WWP1 est présente de façon ubiquitaire dans tous les tissus de l'organisme. Au niveau cellulaire, WWP1 est à la fois dans le cytoplasme, notamment au niveau des endosomes primaires, mais également dans le noyau des cellules, bien que WWP1 ne possède pas de signal d'importation nucléaire (Seo, Lallemand et al. 2004, Chen, Zhou et al. 2008). Cette double localisation cellulaire est en accord avec le fait que WWP1 peut ubiquitiner des protéines cytoplasmiques mais également nucléaires. Il a aussi été montré que la localisation cellulaire de WWP1 pouvait être régulée par la voie de signalisation de Notch. En effet, Notch entraîne la translocation de WWP1 du noyau vers les endosomes primaires où elle colocalise avec WWP1 (Flasza, Nguyen Huu et al. 2006).

### IV. Substrats de WWP1

Plusieurs substrats de WWP1 ont été identifiés (**Fig.17**), certains d'entre eux, décrits ci-dessous, pouvant être impliqués dans les processus cancéreux (Zhi and Chen 2011).

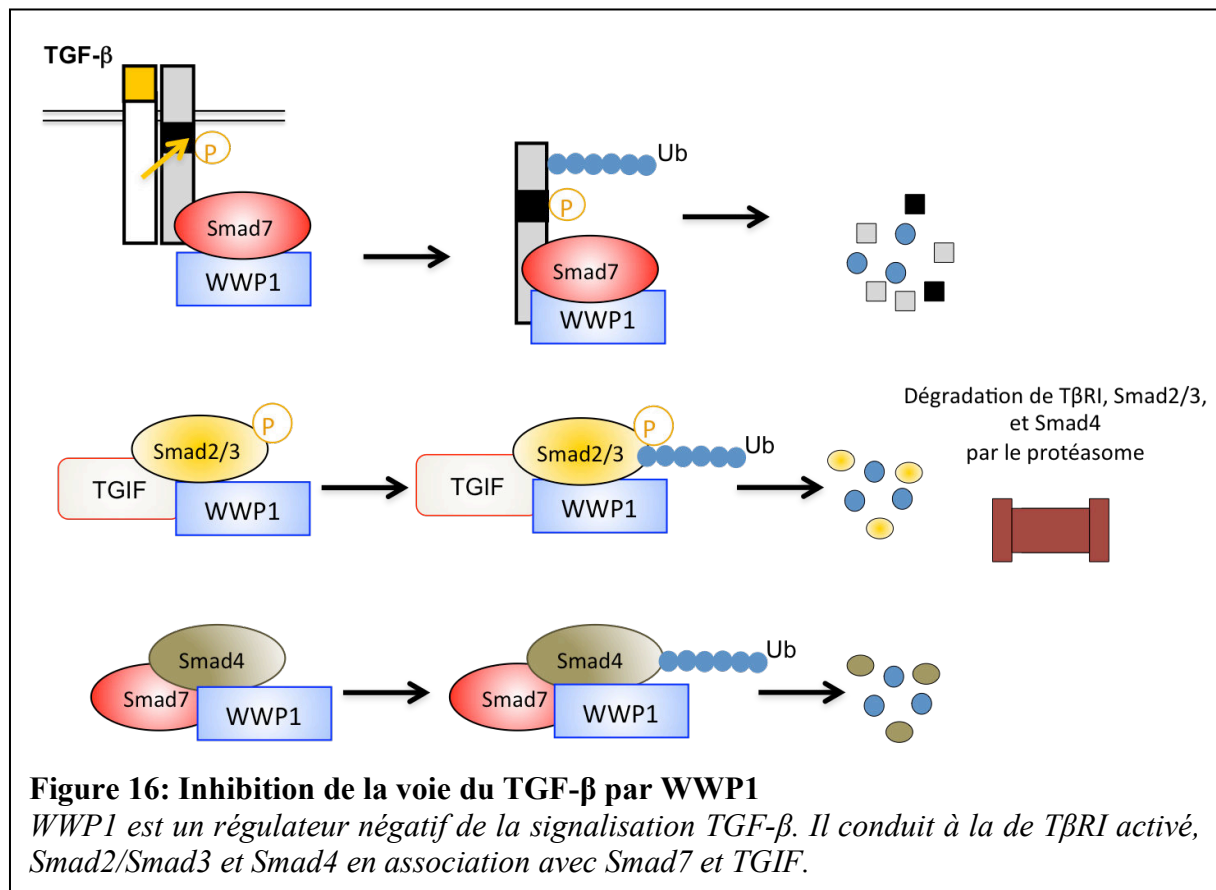
#### IV. A. Composants de la signalisation TGF- $\beta$

Comme décrit précédemment dans le Chapitre 1, la signalisation TGF- $\beta$  est soumise à des régulations par les enzymes E3 ubiquitine ligases, et notamment par la E3 ligase WWP1 (**Fig.16**).

En effet, plusieurs laboratoires, dont le nôtre, ont montré que WWP1 régule la

dégradation de plusieurs protéines participant à la signalisation TGF- $\beta$ . Grâce à ses domaines WW, WWP1 peut interagir avec les protéines I-Smads, Smad6 et Smad7. Suite à son association avec Smad7 et de manière similaire aux E3 ubiquitine ligases Smurf1 et 2, WWP1 entraîne la translocation de Smad7 dans le cytoplasme. Smad7 permet ensuite le recrutement de WWP1 à proximité du récepteur de type I au TGF- $\beta$  (T $\beta$ RI) activé. WWP1 peut alors polyubiquitiner T $\beta$ RI activé, entraînant sa dégradation par le protéasome (Komuro, Imamura et al. 2004, Seo, Lallemand et al. 2004). En réponse au TGF- $\beta$ , WWP1 peut également polyubiquitiner les protéines R-Smad, Smad2 et Smad3, grâce au corépresseur transcriptionnel TGIF. En effet, WWP1, en s'associant *via* son domaine C2 au TGIF (d'où son autre nom Tiul1, pour TGIF Interacting Ubiquitin Ligase), peut interagir avec les protéines R-Smads et entraîner leur polyubiquitination et leur dégradation (Seo, Lallemand et al. 2004). Il semble que WWP1 puisse aussi induire une faible dégradation de Smad4, celle-ci étant fortement augmentée en présence de la protéine I-Smad, Smad7 (Moren, Imamura et al. 2005).

En accord avec ces observations, la diminution de l'expression de WWP1, par transfection stable de shRNA dirigés contre WWP1, augmente la transcription de gènes cibles du TGF- $\beta$ , notamment des gènes *PAI-1* (Plasminogen Activator Inhibitor 1) et *JunB* (Seo, Lallemand et al. 2004). D'un point de vue fonctionnel, la diminution de l'expression de WWP1 amplifie l'effet anti-prolifératif du TGF- $\beta$  dans des cellules cancéreuses prostatiques (Chen, Sun et al. 2007), et confirme l'importance de WWP1 dans la régulation négative de la signalisation TGF- $\beta$ .



## IV. B. La famille des EGFR

Les EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) sont les récepteurs d'une famille d'une douzaine de facteurs de croissance, dont l'EGF. La famille des EGFR est composée de quatre récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase, Erb1/EGFR, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 et ErbB4/HER4. Ces récepteurs sont surexprimés dans de nombreux types de cancers.

Différentes études ont montré que plusieurs membres de la famille des EGFR sont régulés par WWP1. Grâce à ses domaines WW, WWP1 interagit avec le récepteur ErbB4, sur des motifs PPxY situés dans son domaine C-terminal, et absents des autres membres de la famille EGFR. Grâce à cette association, WWP1 ubiquitine ErbB4, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome (Li, Zhou et al. 2009), mais également par les lysosomes selon Feng et ses collaborateurs (Feng, Muraoka-Cook et al. 2009). Il est à noter qu'après son induction par l'héreguline, ErbB4 induit l'expression de BRCA1, un suppresseur de tumeur majeur dans les cancers du sein. En dégradant ErbB4, WWP1 pourrait donc empêcher l'expression de BRCA1 induite par l'héreguline.

WWP1 peut aussi réguler la stabilité d'autres récepteurs de la famille EGFR. WWP1 semble stabiliser les récepteurs EGFR et ErbB2, mais sans les ubiquitiner. Cette stabilisation pourrait être due à l'interaction de WWP1 avec RNF11, une E3 ligase RING, connue pour entraîner la dégradation de ces deux récepteurs. En effet, WWP1 interagit *via* son premier et troisième domaine WW avec RNF11, sur un motif PPxY, et l'ubiquitine. Cette ubiquitination n'entraîne pas la dégradation de RNF11 mais l'inactive, ce qui a pour conséquence de stabiliser EGFR et ErbB2 (Chen, Zhou et al. 2008).

Il semble donc que WWP1 régule les voies de signalisation en aval de certains des récepteurs de la famille EGFR, en causant directement la dégradation de ERbB4 mais également en stabilisant des récepteurs EGFR et ErbB2.

#### **IV. C. Les protéines de la famille KLF**

Les protéines de la famille KLF (Krüppel-Like Factors) sont des facteurs de transcription à domaine "en doigt de zinc" bien décrits. Ils régulent de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la survie, ou encore la différenciation, et sont impliqués dans la cancérogenèse. La surexpression de KLF5 entraîne notamment une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire ainsi que de la croissance tumorale, majoritairement en induisant la transcription du gène *FGFBP* (*Fibroblast Growth Factor Binding Protein 1*) (Zhao, Zhi et al. 2012).

KLF5 possède un motif PPxY qui lui permet de se lier à WWP1. WWP1 peut alors polyubiquitiner KLF5, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome 26S. En accord avec ces résultats, la diminution de l'expression de WWP1 dans des lignées cellulaires cancéreuses mammaires et prostatiques conduit à une stabilisation de KLF5 (Chen, Sun et al. 2005). Cette polyubiquitination de KLF5 par WWP1 peut être inhibée par les protéines TAZ et YAP. Le co-activateur transcriptionnel TAZ interagit avec KLF5 au niveau du site de liaison de WWP1 et inhibe la dégradation de KLF5 par WWP1 (Zhao, Zhi et al. 2012).

La protéine YAP (Yes Associated Protein), considérée comme un oncogène, s'associe également avec KLF5 au niveau de son motif PPxY, inhibant la liaison de WWP1 avec KLF5 et donc la dégradation de KLF5 (Zhi, Zhao et al. 2012). De manière très intéressante, le suppresseur de tumeur LATS1 (Large Tumor Suppressor 1) peut phosphoryler les protéines TAZ et YAP, et inhiber leur action sur KLF5. LATS1 peut donc favoriser la dégradation de KLF5 par WWP1. Il a de plus été montré que WWP1 pouvait aussi induire la polyubiquitination et la dégradation par le protéasome de LATS1 (Yeung, Ho et al. 2013).



Cette dégradation de LATS1 a pour effet une augmentation de la prolifération cellulaire de cellules cancéreuses mammaires.

La protéine KLF2, une autre protéine de la famille KLF, ne contient pas de motif PPxY, mais interagit tout de même avec WWP1 *via* son domaine "auto-inhibiteur" riche en lysine. Tout d'abord, il a été montré que le niveau d'expression de WWP1 est inversement corrélé à celui de KLF2. En accord avec cette observation, WWP1 entraîne la polyubiquitination de KLF2 et sa dégradation par le protéasome. Cependant, de manière surprenante, la forme catalytiquement inactive de WWP1 permet également la polyubiquitination de KLF2. Ceci suggère que WWP1 ne polyubiquitine pas directement KLF2 mais favorise sa polyubiquitination et sa dégradation par une autre E3 ubiquitine ligase (Conkright, Wani et al. 2001, Zhang, Srinivasan et al. 2004).

En régulant le niveau d'expression de ces deux facteurs de transcription, WWP1 peut intervenir dans les processus de cancérogenèse.

#### **IV. D. Les protéines de la famille p53**

p53 est un suppresseur de tumeur crucial impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose en réponse à un stress cellulaire. p53, p63 et p73, trois facteurs de transcription de la famille p53 sont des substrats de WWP1.

La première E3 ubiquitine ligase identifiée comme induisant la polyubiquitination et la dégradation de p53 est Mdm2, une E3 ligase de la famille RING (Momand, Zambetti et al. 1992). En 2007, Laine et ses collaborateurs ont montré que WWP1 est aussi capable d'interagir avec p53, dans son domaine de liaison à l'ADN (Laine and Ronai 2007). Cependant, WWP1 n'entraîne pas la dégradation de p53, mais au contraire augmente sa stabilité. Ceci requiert l'activité catalytique de WWP1 puisque le mutant catalytiquement inactif de WWP1 induit, lui, la déstabilisation de p53. En réalité, l'ubiquitination de p53 par WWP1 induit la translocation de p53 dans le cytoplasme, entraînant une baisse de son activité transcriptionnelle ainsi que sa stabilisation. De plus, il semble qu'il existe une boucle de rétrocontrôle entre p53 et WWP1 puisque p53 inhibe la transcription de WWP1 (Laine and Ronai 2007).

Si WWP1 n'entraîne pas la dégradation de p53, cela ne semble pas le cas pour p63. En effet, WWP1 interagit avec les isoformes TAp63 $\alpha$  et  $\Delta$ Np63 $\alpha$  *via* ses domaines WW. Ainsi, WWP1 peut polyubiquitiner et dégrader les isoformes  $\alpha$  de p63 (Li, Zhou et al. 2008). Néanmoins, une étude menée par Peschiaroli et ses collaborateurs montre que WWP1

polyubiquitine l'isoforme  $\Delta Np63$  avec des chaînes de polyubiquitine liées en Lysine K63. Cette polyubiquitination n'entraînerait pas la dégradation de  $\Delta Np63$  mais une augmentation de son activité transcriptionnelle (Peschiaroli, Scialpi et al. 2010).

p73 est un facteur de transcription pro-apoptotique. Cependant une isoforme de p73, déléetée de son domaine N-terminal ( $\Delta Np73$ ) a elle une fonction anti-apoptotique. Le ratio d'expression entre ces deux isoformes est donc critique pour le devenir de la cellule. Chaudary et ses collaborateurs ont montré que la E3 ubiquitine ligase WWP2 ubiquitine et dégrade p73, mais que, après hétéromérisation avec WWP1, le complexe WWP2-WWP1 cible lui spécifiquement l'isoforme  $\Delta Np73$  pour dégradation. C'est la phosphatase PPMG1 qui contrôle la dimérisation de WWP2 avec WWP1 (Chaudhary and Maddika 2014).

Il semble donc que WWP1 puisse réguler différemment les membres de la famille p53, selon le type et le contexte cellulaire.

#### **IV. E. Ezrin**

Ezrin est une protéine du cytosquelette appartenant à la famille ERM (Ezrin, Radixin, Moesin). Elle est un substrat du récepteur transmembranaire tyrosine-kinase Met de l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) et semble nécessaire à la formation de métastases dans le cancer du sein (Crepaldi, Gautreau et al. 1997).

Ezrin interagit avec WWP1 grâce à un motif PPxY situé dans son domaine C-terminal liant les domaines WW de WWP1. L'association de Ezrin avec WWP1 permet à WWP1 de polyubiquitiner Ezrin, mais cette ubiquitination n'entraîne ni la dégradation, ni la stabilisation d'Ezrin. Par contre, l'interaction de WWP1 avec Ezrin stabilise le récepteur Met, probablement en empêchant la dégradation de Met par une autre E3 ubiquitine ligase (Zaarour, Chirivino et al. 2012).

#### **IV. F. Inducteurs de la différenciation ostéoblastique, Runx2, JunB et CXCR4**

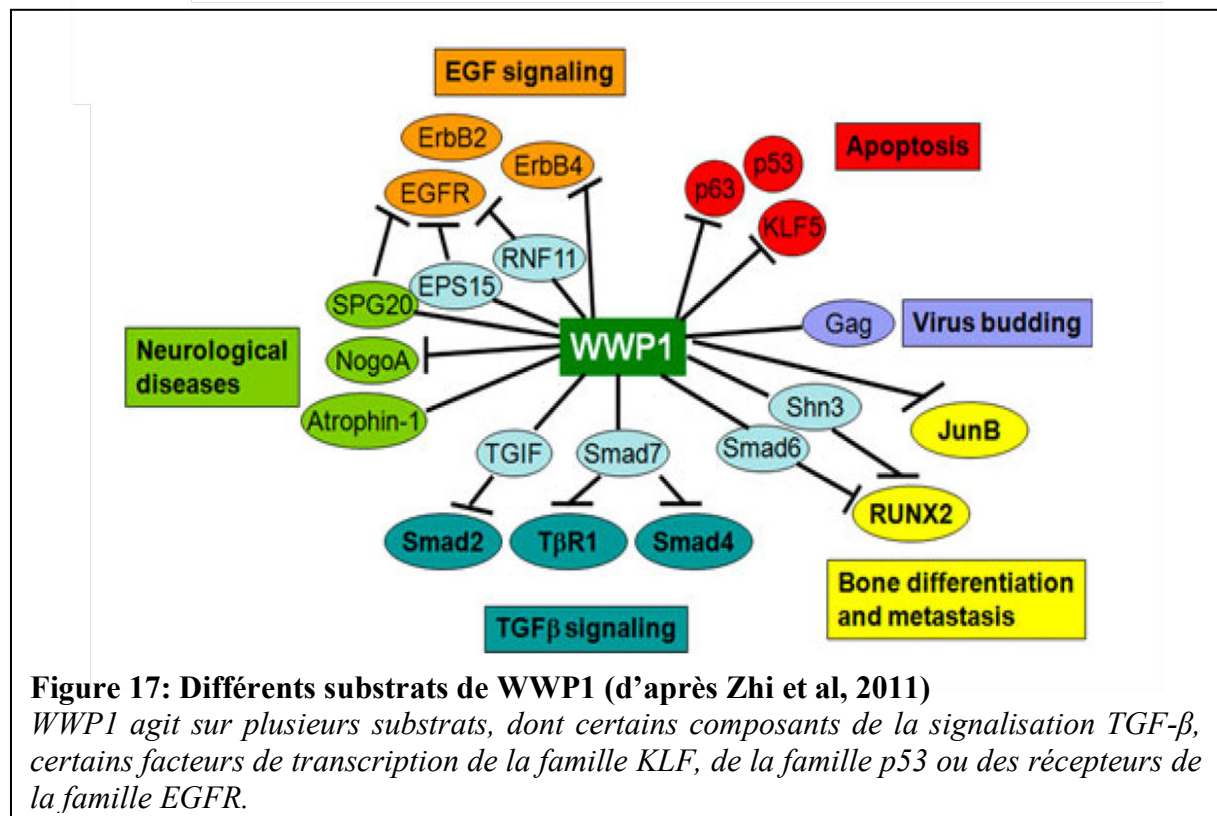
Runx2 est un facteur de transcription majeur dans la différenciation ostéoblastique. WWP1 interagit avec Runx2 et cette interaction est renforcée en présence de la protéine à « doigt de zinc » Schnurri-3 (Shn3). Shn3 agit comme une protéine adaptatrice entre WWP1 et Runx2, et permet à WWP1 de polyubiquitiner Runx2 et d'induire sa dégradation (Jones, Wein et al. 2006). Il a également été montré que Smad6 favorise la dégradation de Runx2 par WWP1

(Shen, Chen et al. 2006).

WWP1 peut également ubiquitiner JunB, un autre facteur de transcription impliqué, entre autre, dans la formation des ostéoblastes. La polyubiquitination de JunB et sa dégradation par WWP1 sont induites après stimulation de cellules souches mésenchymateuses au  $TNF\alpha$ , ce qui pourrait inhiber la différenciation de ces cellules en ostéoblastes, et induire ainsi de l'ostéoporose (Zhao, Huang et al. 2011, Shu, Zhang et al. 2013).

CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G, qui joue un rôle important lors de la formation de métastases osseuses. Il a été montré que la dégradation lysosomale de CXCR4, induite par la chémokine CXCL12 (C-X-C motif chemokine 12), produite notamment dans la moelle osseuse, est réduite dans des cellules cancéreuses mammaires dont l'expression de WWP1 est diminuée par shRNA, suggérant que CXCR4 pourrait être un substrat de WWP1. Il est intéressant de noter que WWP1, en induisant notamment la dégradation de CXCR4 semble inhiber la formation de métastases osseuses issues d'un cancer mammaire chez la souris et avoir un rôle anti-métastatique (Subik, Shu et al. 2012).

WWP1, en régulant la stabilité de Runx2, JunB et CXCR4, pourrait donc intervenir à différents niveaux lors de la formation de métastases osseuses dans les cancers du sein et de la prostate. Son rôle ne serait peut-être pas uniquement oncogénique mais plus complexe dans les processus de cancérogenèse.



## **V. WWP1 et les pathologies**

WWP1 est actuellement impliquée dans différentes pathologies, telles que des maladies infectieuses, neurologiques ou le cancer.

### **V. A. Implication de WWP1 dans des maladies infectieuses**

Plusieurs études ont suggéré que WWP1 pouvait jouer un rôle dans certaines maladies infectieuses, notamment grâce à son rôle dans l'internalisation des virus. Certaines protéines capitales dans l'assemblage des enveloppes virales et la libération des virus, comme les protéines Gag, interagissent *via* un motif PPxY avec des protéines contenant des domaines WW. Dans ce contexte, il a été montré que WWP1 peut interagir et monoubiquitiner les protéines Gag (Heidecker, Lloyd et al. 2007). La mutation dans ces protéines Gag, du résidu lysine monoubiquitiné par WWP1, inhibe le bourgeonnement des particules virales, suggérant que l'ubiquitination des protéines Gag par WWP1 joue un rôle clé dans ce processus (Heidecker, Lloyd et al. 2007). En accord avec cette observation, l'expression de mutants dominant-négatif de WWP1 semble inhiber la libération du virus HTLV-1 (ou virus T-lymphotropique humain) ou Ebola (Zhi and Chen 2011). Les domaines WW de WWP1 pourraient donc être des cibles thérapeutiques pour limiter la progression de certains virus.

### **V. B. Implication de WWP1 dans des maladies neurologiques**

Des études suggèrent que WWP1 pourrait avoir une fonction dans certaines maladies neuronales. En effet, WWP1 interagit avec la protéine Atrophine, grâce à ses domaines PPxY (Wood, Yuan et al. 1998). La protéine Atrophine est une protéine impliquée dans l'atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne. Elle a, comme la protéine Huntingtine, un motif répété polyGlutamine (ou PolyQ). De nombreuses maladies dégénératives sont caractérisées par la présence de protéines à motifs polyQ polyubiquitinées, qui s'accumulent sous forme d'agrégat dans la cellule parce qu'elles ne sont pas dégradées par le protéasome. Néanmoins, les conséquences de l'interaction entre l'atrophine et WWP1 ne sont pas connues.

WWP1 interagit également avec la protéine Nogo-A (Qin, Pu et al. 2008). Nogo-A est un inhibiteur de la régénération du système nerveux central (CNS), en inhibant notamment la croissance des neurones. Il semblerait que WWP1 puisse ubiquitiner et dégrader Nogo-A, mais ces observations restent encore à être publiées (Qin, Pu et al. 2008).

## **V. C. Implication de WWP1 dans la cancérogenèse**

### **V. C. 1. Surexpression de WWP1 dans les cancers mammaires et prostatiques**

Le gène *WWP1* se situe sur le chromosome 8q21, un locus fréquemment amplifié dans les cancers, et notamment dans les cancers mammaires et prostatiques. De fait, le gène est amplifié dans plus de 30% de tumeurs mammaires et prostatiques (Chen, Sun et al. 2007). Cette amplification génique est associée à une augmentation du niveau de l'ARNm de WWP1 ainsi que du taux protéique de WWP1 dans les cancers du sein et de la prostate. En accord avec cela, l'ARNm de WWP1 a aussi été souvent retrouvé surexprimé dans les lignées cellulaires cancéreuses mammaires et prostatiques (Chen, Sun et al. 2007, Chen, Zhou et al. 2007).

Il est intéressant de noter que Chen et ses collaborateurs ont observé une corrélation positive entre l'expression de WWP1 et le statut ER<sup>+</sup> (Estrogen Receptor) dans des lignées cellulaires cancéreuses mammaires mais cette corrélation n'a pas été retrouvée dans l'étude de Nguyen (Nguyen Huu, Ryder et al. 2008, Chen, Zhou et al. 2009).

WWP1 est actuellement considéré comme ayant une activité oncogénique potentiel dans les cancers du sein et de la prostate.

### **V. C. 2. Fonctions protumorales de WWP1**

Comme décrit précédemment, WWP1 (**Chapitre 3/ IV.**) dégrade ou stabilise plusieurs de ses substrats dont la dérégulation peut favoriser la cancérogenèse.

D'un point de vue fonctionnel, la surexpression de WWP1 induit la prolifération des cellules mammaires MCF10A, alors que la diminution de son expression, par transfection de siRNA dirigés contre WWP1, réduit la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF7 et HCC1500, et prostatiques PC3 (Chen, Sun et al. 2007, Chen, Zhou et al. 2007). La diminution de l'expression de WWP1 amplifie également la réponse anti-proliférative au TGF- $\beta$  dans les cellules cancéreuses prostatique PC3 (Chen, Sun et al. 2007). Ceci est en accord avec le fait que WWP1 est capable de polyubiquitiner et causer la dégradation de T $\beta$ RI, Smad2 ou Smad4, des composants essentiels à la transduction du signal TGF- $\beta$ . Il a été montré que la perte de réponse anti-proliférative au TGF- $\beta$  est un événement précoce dans la cancérogenèse. WWP1, en favorisant la perte de ces réponses, pourrait donc favoriser la

progression tumorale. Il a également été montré que la surexpression ou la diminution de l'expression de WWP1 dans des cellules cancéreuses mammaires, inhibe ou favorise, respectivement, l'apoptose (Chen, Sun et al. 2007, Chen, Zhou et al. 2007). De manière très intéressante, l'inhibition de WWP1 peut induire l'apoptose de cellules cancéreuses mammaires résistantes à l'apoptose induite par le TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), une drogue ayant une forte activité anti-tumorale dans les cancers du sein. En effet, WWP1 semble inhiber l'apoptose en réprimant l'activation de la caspase 8 par un mécanisme encore non compris mais nécessitant l'activité ligase de WWP1. En accord avec cela, la surexpression de WWP1 semble corrélér avec la résistance à TRAIL dans plusieurs lignées cancéreuses mammaires (Zhou, Liu et al. 2012).

Enfin, Nguyen et ses collaborateurs ont montré que la surexpression de WWP1 pouvait augmenter la capacité de cellules cancéreuses mammaires à proliférer de manière indépendante du substrat (test de soft-agar, reflétant les propriétés transformantes des cellules), alors qu'au contraire, la diminution de l'expression de WWP1 par siRNA réduit cette capacité (Nguyen Huu, Ryder et al. 2008).

L'ensemble de ces données suggère que WWP1 favorise la progression tumorale.

### **V. C. 3. Fonctions anti-métastatiques de WWP1**

Bien que la plupart des données de la littérature indiquent que WWP1 ait une action oncogénique dans les tumeurs prostatiques et mammaires, il semble que la diminution de l'expression de WWP1 dans les tumeurs mammaires soit de mauvais pronostic. En effet, Nguyen et ses collaborateurs ont observé que la perte d'expression de WWP1 dans des tumeurs cancéreuses mammaires semble être de plus mauvais pronostic qu'une expression normale ou élevée de WWP1 (Nguyen Huu, Ryder et al. 2008).

De plus, il a été montré que WWP1 permet la dégradation de la protéine CXCR4, induite par la chémokine CXCL12 (**cf. Chapitre 3/ IV. F**), ce qui inhiberait la formation de métastases osseuses issues de cellules cancéreuses mammaires. En effet, des cellules cancéreuses mammaires MDA.MB.231, dont l'expression de WWP1 est diminuée par shRNA, ont une capacité de migration augmentée. De plus, des souris nude ayant subi une injection dans le ventricule gauche de ces cellules développent plus de métastases osseuses que les souris contrôles (Subik, Shu et al. 2012). Ces résultats indiquent que WWP1 peut réduire les métastases osseuses issues de tumeurs cancéreuses mammaires.

S'il est indéniable que WWP1 ait des propriétés oncogéniques dans les cellules

prostatiques ou mammaires, il est intéressant de noter que WWP1 semble également avoir des propriétés anti-métastatiques et que sa baisse d'expression est corrélée avec un mauvais pronostic. Le rôle de WWP1 n'est donc peut-être pas aussi simple qu'il n'y paraît dans la cancérogenèse.

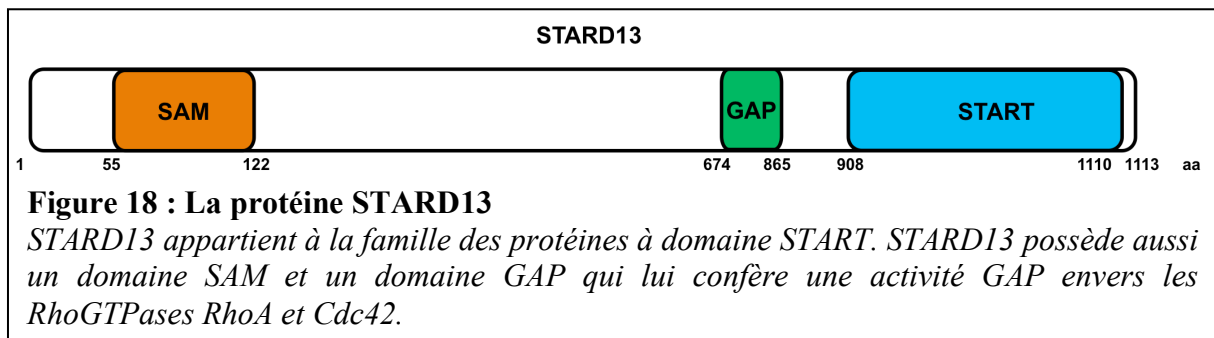
Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à un nouveau partenaire potentiel de WWP1 découvert grâce à un crible double-hybride chez la levure. Ce nouveau partenaire est la protéine STARD13, une protéine à activité RhoGAP considérée actuellement comme un suppresseur de tumeur.

## Chapitre 4 : La RhoGAP STARD13

Ching et ses collaborateurs ont recherché de nouveaux gènes suppresseurs de tumeurs dans la région chromosomique 13q, cible fréquente de perte d'hétérozygotie (LOH ou Loss Of Heterozygosity), notamment dans les carcinomes hépatocellulaires (HCC). Ils ont identifié en 2003 le gène *STARD13* (START Domain Containing 13), localisé en 13q12.3. *STARD13* fut à l'origine nommé *DLC2* (Deleted in Liver Cancer 2) dû à son homologie de séquence avec *DLC1* (Ching, Wong et al. 2003).

### I. Structure de STARD13

La protéine STARD13 est une protéine de 125 kDa qui possède trois types de domaines structuraux (**Fig.18**) : un domaine SAM, un domaine GAP et un domaine START. Il existe 4 isoformes différentes de STARD13, nommés STARD13 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ . STARD13 $\alpha$  représente la forme entière de STARD13, STARD13 $\beta$  est très similaire avec seulement quelques résidus différents dans sa région N-terminale. En revanche, les formes STARD13 $\gamma$  et  $\delta$  sont tronquées et ne possèdent respectivement pas de domaine SAM et de domaines GAP et START (Leung, Ching et al. 2005).



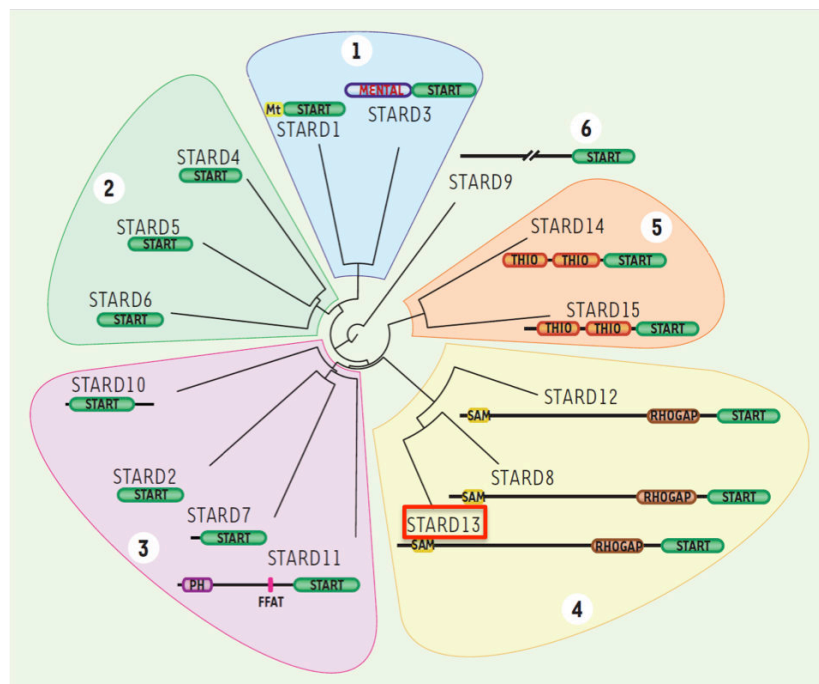
### I. A. STARD13, une protéine à domaine START

#### I. A. 1. Généralités

Les protéines à domaine START [(STreoidogenic Acute regulatory protein) Related lipid Transfer] représentent une famille de 15 protéines, et sont nommées STARD (START



Domain Containing) (**Fig.19**). Ces protéines ont des fonctions cellulaires diverses, qui dépendent de la nature de leur domaine START. Elles interviennent notamment dans le métabolisme des lipides, le transport intracellulaire non vésiculaire des lipides ou encore la transduction du signal (**Fig. 20**) (Alpy, Legueux et al. 2009).



**Figure 19 : La famille des protéines à domaine START (d'après Alpy et al, 2009)**  
 Les protéines à domaine START sont au nombre de 15 chez l'Homme. Ces protéines sont divisées en 6 sous-familles dont celle des protéines GAP contenant STARD12 (DLC1), STARD13 (DLC2) et STARD8 (DLC3).

<u>Protéines</u>	<u>Fonction cellulaire</u>
STARD1 STARD3	transporteurs spécifiques du cholestérol
STARD4 STARD5 STARD6	autres transporteurs de stérols dont le cholestérol
STARD2 STARD7 STARD10 STARD11	transporteurs de lipides comme la phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine ou les céramides
STARD8 ou DLC3 STARD12 ou DLC1 STARD13 ou DLC2	protéines à activité RhoGAP
STARD14 STARD15	protéines à domaine thioestérases dont l'activité catalytique est peu connue
STARD9	fonction inconnue

**Figure 20 : Tableau récapitulatif de la famille des protéines STARD**  
*La famille des protéines STARD est constituée de 15 protéines possédant toutes un domaine START de liaison lipidique. La plupart de ces protéines sont des transporteurs de lipides. Parmi cette famille, STARD8, STARD12 et STARD13 possèdent cependant un domaine GAP leur conférant une activité RhoGAP, elles sont appelées les RhoGAP START.*

### I. A. 2. Le domaine START

Les protéines STARD possèdent toutes un domaine C-terminal conservé nommé START d'environ 210 acides aminés qui peut se lier à certains lipides, comme par exemple des stérols ou des céramides. Ce domaine est absent chez les levures et les archeobactéries mais on le retrouve chez les eubactéries ou les plantes. Sa structure tridimensionnelle forme une cavité interne amphiphile, ce qui permet aux lipides liés par ce domaine d'être isolés du milieu aqueux extérieur (Soccio and Breslow 2003, Alpy and Tomasetto 2005).

### **I. A. 3. La sous-famille des RhoGAP-START**

STARD13 appartient à la sous-famille des RhoGAP-START, avec STARD12 et STARD8 (**Fig.19**). Ces 3 protéines possèdent toutes un domaine N-terminal SAM, un domaine RhoGAP et un domaine C-terminal START.

Le domaine SAM (Sterile Alpha Motif) est un domaine protéique très courant, impliqué dans l'homo ou l'hétéromérisation et retrouvé par exemple dans les protéines de la famille p53 comme p63 et p73.

Le domaine RhoGAP (Rho-GTP Activating Protein) est impliqué dans la régulation des protéines GTPases Rho (**cf. Chapitre 5/ IV. C. 1.**).

En revanche, la spécificité de ligand du domaine START de cette sous-famille n'est pas connue. Il est cependant possible que ce domaine START, en fonction des lipides auxquels il se lie, puisse réguler l'activité du domaine RhoGAP de ces protéines (Alpy, Legueux et al. 2009) (Braun and Olayioye 2015).

STARD8, STARD12 et STARD13 sont structurellement très proches, ce qui suggère qu'elles ont des fonctions très similaires. Il a d'ailleurs été montré que STARD12 et STARD13 sont toutes les deux des régulateurs du cytosquelette d'actine. Néanmoins, leurs profils d'expression ne se superposent pas, suggérant qu'elles exercent peut être des fonctions proches dans des tissus différents. Il n'y a d'ailleurs pas de compensation du phénotype léthal des souris knock-out STARD12<sup>-/-</sup> par STARD13. Il est à noter que ces trois protéines sont actuellement considérées comme des suppresseurs de tumeur car leur expression est fréquemment diminuée dans différents types de cancers (Alpy, Legueux et al. 2009, Lukasik, Wilczek et al. 2011).

### **I. B. STARD13, une protéine à domaine RhoGAP**

Le domaine RhoGAP est le domaine responsable de l'activité GAP (GTPase Activating Proteins) dans les protéines RhoGAPs. En effet, les RhoGTPases sont des protéines existant sous deux états, activées ou inactivées, selon qu'elles fixent respectivement le GTP ou le GDP (**cf. Chapitre 5/ I. B**). Grâce à leur domaine GAP, les protéines RhoGAPs permettent d'activer l'activité GTPasique intrinsèque des RhoGTPases, ce qui les rend inactives (**Fig.25**).

Le domaine GAP est un domaine d'environ 200 acides aminés dont plus de 20% de la séquence est conservé dans toutes les protéines RhoGAPs (El-Sitt, Khalil et al. 2012). Ce domaine a une structure en boucle avec notamment un résidu arginine fortement conservé

responsable de l'activation de l'activité GTPasique des RhoGTPases (Rittinger, Walker et al. 1997). Concernant STARD13, trois résidus ont été identifiés dans son domaine GAP comme étant importants pour son activité GAP, les résidus K618, R622 et R699 (Ching, Wong et al. 2003, Leung, Ching et al. 2005).

STARD13, comme STARD12 et STARD8, possède une activité GAP *in vitro* envers les GTPases RhoA et Cdc42 (Nagaraja and Kandpal 2004, Leung, Ching et al. 2005). Cependant, l'activité RhoGAP de STARD13 a été majoritairement décrite envers RhoA *in vivo* (Ching, Wong et al. 2003, Nagaraja and Kandpal 2004, Leung, Ching et al. 2005, Petzold, Naumann et al. 2013). En accord avec son activité GAP, la transfection stable de STARD13 dans la lignée cellulaire d'hépatocarcinome HepG2 réduit le niveau de RhoA actif dans la cellule. De plus, la surexpression de STARD13 inhibe la formation de fibres de stress dépendante de RhoA dans la lignée cellulaire HeLa.

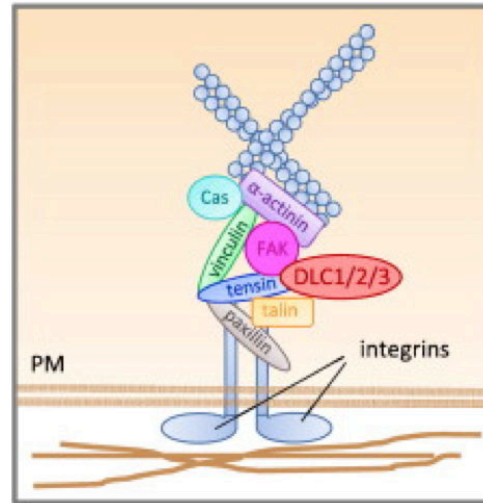
Une étude récente vient néanmoins de mettre en évidence que STARD13 pourrait aussi avoir une activité RhoGAP envers Cdc42 *in vivo*. En effet, STARD13 semble nécessaire à l'alignement des chromosomes lors de la mitose, ceci *via* son action sur Cdc42 (Vitiello, Ferreira et al. 2014).

## II. Localisation cellulaire de STARD13

STARD13, comme STARD12 et STARD8, est localisé au niveau des points d'adhésion focaux, structure qui se lie au cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire, grâce notamment à son interaction avec la protéine Tensin-2, un composant des points d'adhésion focaux (**Fig.21**). La région de STARD13 nécessaire à cette interaction est un domaine de liaison au domaine SH2 de la Tensin-2, similaire à celui retrouvé dans la protéine STARD12 et qui se situe entre les domaines SAM et Rho-GAP (acides aminés 318-472) (Kawai, Seike et al. 2009).

STARD13 peut aussi être localisé au niveau des microtubules, ce qui lui permet de réguler la mitose, *via* son activité GAP envers Cdc42 (**cf. Chapitre 4/ III. A. 2.**). Cette localisation de STARD13 se fait *via* son domaine SAM, qui lui permet de se lier directement aux microtubules. STARD13 forme alors un complexe avec la kinésine Kif1B, une protéine impliquée dans la séparation des chromosomes lors des divisions cellulaires, le domaine SAM de STARD13 interagissant directement avec le domaine FHA (ForkheadAssociated) de

Kif1B. Les deux protéines peuvent alors réguler l'organisation des microtubules et notamment permettre leur maintien lors de la mitose (Vitiello, Ferreira et al. 2014).



**Figure 21 : Localisation de STARD13/DLC2 au niveau des points d'adhésion focaux (d'après Braun et al, 2015)**

Il a été montré que STARD13 pouvait aussi être localisé au niveau des mitochondries dans des cellules d'hépatomes Huh-7 et dans les cellules épithéliales cancéreuses de col de l'utérus HeLa. Cette localisation est due à son domaine START, et a également été observée pour la protéine STARD12. Néanmoins, la spécificité de ligand du domaine START de STARD13 étant inconnue, la fonction de STARD13 au niveau des mitochondries dans ces cellules reste encore à découvrir (Ng, Chan et al. 2006).

### **III. Fonctions biologiques de STARD13**

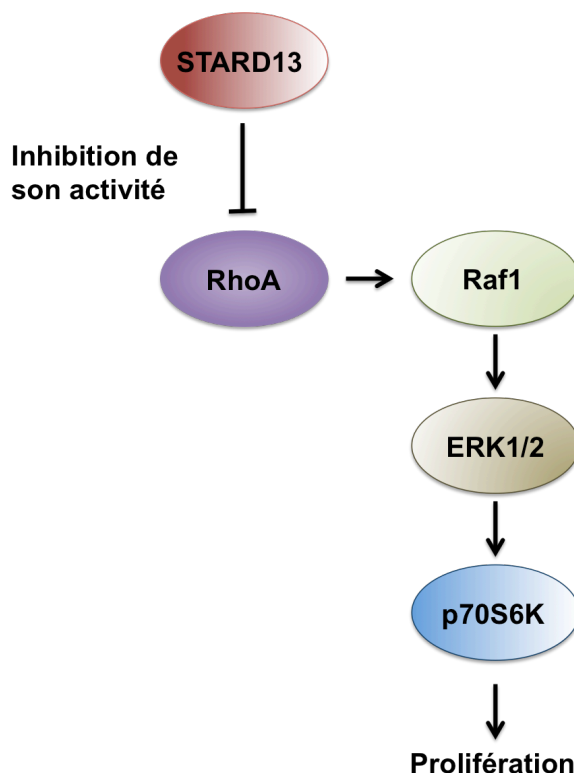
#### **III. A. Régulation du cycle cellulaire**

##### **III. A. 1. Inhibition en phase G0/G1 du cycle cellulaire**

Il a été proposé que STARD13 réprime la prolifération cellulaire en inactivant la voie de signalisation Raf-ERK1/2-p70S6Kinase. En effet, la lignée cellulaire d'hépatocarcinome HepG2 surexprimant de manière stable STARD13 présente un pourcentage de cellules en

phase G1 beaucoup plus important que les cellules ne surexprimant pas STARD13, suggérant que STARD13 bloque la progression du cycle cellulaire en phase G1. Il a été montré que la surexpression de STARD13 dans la lignée cellulaire HepG2 entraîne une diminution de la phosphorylation de la serine-thréonine kinase Raf-1, des kinases ERK1 et ERK2, conduisant à une inhibition de la phosphorylation de la kinase p70S6K (**Fig.22**). Or, la kinase p70S6K est cruciale pour la prolifération des cellules HepG2 puisque le traitement de ces cellules par la rapamycine, un inhibiteur de l'activité de p70S6K, inhibe leur prolifération cellulaire. L'activité de Raf-1 peut être inhibée par une forme dominante-négative de RhoA, en association avec Ras. Il semble donc possible que l'inhibition de la phosphorylation de Raf-1 par STARD13 soit due à l'activité RhoGAP de STARD13 sur RhoA (Leung, Yam et al. 2010).

L'effet anti-prolifératif de STARD13 a également été observé dans des lignées cancéreuses colorectales ainsi que dans la lignée cellulaire d'astrocytome T98G (El-Sitt, Khalil et al. 2012, Nasrallah, Saykali et al. 2014). En effet, la surexpression de STARD13 dans ces lignées réduit la prolifération alors que la diminution de son expression la favorise. De manière similaire à ce qui est observé dans les cellules HepG2, la diminution de l'expression de STARD13 dans les lignée T98G entraîne également une augmentation de la phosphorylation de la kinase ERK. Ceci suggère que STARD13 exerce son effet anti-prolifératif via l'inhibition de la voie de signalisation Raf1/ERK/p70S6K et RhoA.



**Figure 22 : Rôle de STARD13 dans la régulation de la prolifération**

*STARD13, en inhibant l'activité de RhoA via son activité RhoGAP, agit sur la voie Raf1/ERK/p70S6K, et peut ainsi réguler la prolifération cellulaire.*

### III. A. 2. Inhibition du bon déroulement de la mitose

Comme décrit précédemment (cf. **Chapitre 4/ II.**), STARD13 peut se lier aux microtubules et s'associer à la kinésine Kif1B. Il a été montré que la diminution de l'expression de STARD13, par transfection de siRNA, dans des cellules épithéliales de cornée (HCE) ou des cellules épithéliales cancéreuses du col de l'utérus HeLa, entraîne un défaut d'alignement des chromosomes lors de la mitose, bloquant le passage de la prométaphase à la métaphase (Vitiello, Ferreira et al. 2014). Ceci semble être dû à l'activité RhoGAP de STARD13 envers la RhoGTPase Cdc42, puisque la transfection de siRNA dirigés contre Cdc42 inverse ce défaut d'alignement des chromosomes. L'un des effecteurs majeurs de Cdc42 à ce niveau est la protéine mDia3. Les auteurs de cette étude ont montré que les complexes STARD13/Kif1B et Cdc42/mDia3 exerçaient un rôle opposé sur la stabilisation des microtubules. Il semble donc que STARD13, en association avec Kif1B, régule l'activité de Cdc42, permettant ainsi un positionnement adéquat des chromosomes et un bon déroulement de la mitose.

Nous avons vu précédemment que STARD13 peut bloquer le cycle cellulaire en

phase G1 en agissant sur RhoA. Il est intéressant de noter que STARD13 peut donc réguler le cycle cellulaire lors de différentes phases, *via* les RhoGTPases RhoA et Cdc42.

### **III. A. 3. Au cours du développement embryonnaire du pancréas**

Grâce à son effet sur la prolifération, STARD13 semble jouer un rôle au cours du développement embryonnaire du pancréas. En effet, Petzold et ses collaborateurs ont observé que des souris transgéniques, dont le gène *STARD13* a été invalidé spécifiquement dans le pancréas, présentent un développement incomplet du pancréas, indiquant que STARD13 est nécessaire à la morphogenèse durant le développement embryonnaire de la souris (Petzold, Naumann et al. 2013). Le défaut de développement pancréatique de ces souris vient d'une diminution de la prolifération cellulaire, particulièrement des cellules progénitrices dans les premiers stades du développement embryonnaire. Lors du développement pancréatique, STARD13 semble donc être un régulateur positif de la prolifération. Les cellules dont le gène *STARD13* a été invalidé présentent une augmentation de la GTPase RhoA activée, ainsi qu'une augmentation des filaments d'actine polymérisés. De manière intéressante, il semble que cette réorganisation du cytosquelette d'actine a pour conséquence une diminution de la phosphorylation des kinases ERK1 et ERK2, qui serait à l'origine de la diminution de la prolifération cellulaire dans le développement embryonnaire pancréatique. Ce phénomène est réversé par l'inhibition de RhoA, suggérant que STARD13 est nécessaire au bon développement pancréatique de la souris grâce à son effet sur la prolifération *via* RhoA et les kinases ERK.

Il est intéressant de noter que deux autres équipes ont établi des souris transgéniques dont le gène *STARD13* a été invalidé. Ces souris sont viables, anatomiquement normales mais Yau et ses collaborateurs indiquent qu'elles sont plus petites. Aucune remarque n'a été indiquée quant à un défaut de développement de leur pancréas (Yau, Leung et al. 2009, Lin, Chen et al. 2010)

### **III. B. Régulation de la migration**

Hanna et ses collaborateurs suggèrent que STARD13 est également impliqué dans la migration (Hanna, Khalil et al. 2014). Ils proposent en effet que l'inactivation de RhoA par STARD13 est nécessaire après la formation de points d'adhésion focaux pour que la cellule se détache de son substrat. Cependant, plusieurs études ont montré que STARD13 était un



inhibiteur de la migration cellulaire. Cela a été décrit dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7 et MDA.MB.231, dans les cellules endothéliales HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) ainsi que dans la lignée cellulaire d'hépatocarcinome HepG2 (Leung, Ching et al. 2005, Lin, Chen et al. 2010, Tang, Zhang et al. 2012). De plus, une des cibles du micro-RNA 125b (miR-125b), qui est capable d'induire la migration cellulaire, est l'ARNm de STARD13 (Tang, Zhang et al. 2012). Ceci conforte l'hypothèse que STARD13 est bien un régulateur négatif de la migration cellulaire, au moins dans certaines lignées cancéreuses mammaires (Tang, Zhang et al. 2012). La capacité de STARD13 à inhiber la migration de ces différentes lignées cellulaires semble être due à son activité GAP envers la protéine RhoA. Néanmoins, les mécanismes mis en jeu n'ont pas été précisément décrits, probablement dû au fait que le rôle des RhoGTPases au cours de la migration est très complexe (cf. **Chapitre 5/ III. B.**). Il a cependant été proposé que l'activation de RhoA est nécessaire à la migration cellulaire, car elle permet la formation de points d'adhésion focaux, sur lesquels les cellules "s'appuient" pour migrer sur leur substrat. Il est donc envisageable que STARD13, en inhibant l'activation de RhoA, inhibe cette formation de points d'adhésion focaux et réduit ainsi la migration cellulaire.

### **III. C. Régulation de l'invasion**

STARD13 semble également pouvoir agir sur l'invasion cellulaire. Plusieurs études ont en effet montré que la diminution de l'expression de STARD13 par siRNA entraîne une augmentation de l'invasion cellulaire des lignées cancéreuses mammaire MDA.MB.231 et colorectales Caco-2 HT-29 (Hanna, Khalil et al. 2014, Nasrallah, Saykali et al. 2014). Il est intéressant de noter que les cellules MDA.MB.231, dont l'expression de RhoA est diminuée par siRNA, ont, elles, une diminution de l'invasion de près de 40% (Pille, Denoyelle et al. 2005). Il est donc possible d'envisager que STARD13, *via* son rôle inhibiteur de l'activité de RhoA, est un régulateur négatif de l'invasion cellulaire. En effet, l'invasion cellulaire peut se faire à travers la dégradation de la matrice extracellulaire, au niveau des points focaux d'adhésion régulés par RhoA (Nasrallah, Saykali et al. 2014).

## IV. STARD13, une protéine suppresseur de tumeur

*STARD12/DLC1* a été le premier gène identifié dans la famille des RhoGAPs START. Ce gène est situé sur le chromosome 8p21.22, un locus sujet à des pertes d'hétérozygotie dans de nombreux cancers dont les carcinomes hépato-cellulaires (HCC), et est considéré comme un suppresseur de tumeur (Liao and Lo 2008). Les deux autres membres de la famille, STARD13 et STARD8, ont été identifiés plus tard et sont eux aussi décrits comme suppresseurs de tumeur potentiels. En effet, le gène *STARD13* est localisé en 13q12.3 une région chromosomique qui présente également de fréquentes pertes alléliques (LOH) dans les cancers. C'est notamment dans cette région qu'est situé le gène *BRCA2*, un suppresseur de tumeur majeur des cancers du sein. L'expression de *STARD13*, comme *STARD12* et *STARD8*, est d'ailleurs diminuée dans plusieurs types de cancers tels que les HCC, les cancers du sein ou du côlon (Ullmannova and Popescu 2006, Durkin, Ullmannova et al. 2007).

L'activité suppresseur de tumeur de STARD13 est régulée par sa phosphorylation. En effet, la kinase Akt phosphoryle STARD13 et STARD12 sur deux résidus sérine conservés. Les conséquences de cette phosphorylation par Akt ont été étudiées pour STARD12. Une fois phosphorylée par Akt, STARD12 perd sa capacité à inhiber la tumorigenèse hépatique ainsi que les métastases issues de ces tumeurs hépatiques dans un modèle murin (Ko, Chan et al. 2010). Il serait intéressant d'étudier si la phosphorylation de STARD13 par Akt permet également de réprimer son activité suppresseur de tumeur.

### IV. A. Cancer du foie

Près de 20% des hépato-carcinomes (HCC) présentant des pertes d'hétérozygotie (LOH) ont une diminution de l'expression de l'ARNm de STARD13 d'au moins deux fois. De plus, l'expression de STARD13, dans les HCC, est corrélée positivement avec le niveau de différenciation des cellules et négativement avec l'expression de RhoA (Xiaorong, Wei et al. 2008). En plus d'une activité RhoGAP envers RhoA, STARD13 pourrait donc jouer un rôle dans la régulation de la stabilité de RhoA. En accord avec ces données, il semble qu'une diminution de l'expression de STARD13 dans les HCC soit associée à un plus mauvais pronostic que les HCC ayant une expression de STARD13 plus forte (Xiaorong, Wei et al. 2008).

D'un point de vue fonctionnel, la surexpression de STARD13 dans les cellules

d'hépatocarcinomes HepG2 réduit leur capacité à proliférer, à pousser dans des conditions de non-adhésion et à migrer, alors que la diminution de son expression favorise la prolifération de ces cellules ainsi que leur capacité migratoire (Leung, Ching et al. 2005), suggérant que STARD13 est bien un suppresseur de tumeur dans les HCC.

L'analyse des souris transgéniques dont le gène *STARD13* a été invalidé (souris *STARD13<sup>-/-</sup>*), ne permet cependant pas de confirmer le rôle suppresseur de tumeur de STARD13 puisque ces souris ne développent pas de tumeurs spontanées (Yau, Leung et al. 2009). De même, les tumeurs du foie, induites par le carcinogène DEN (DiEthylNitrosamine), ne sont pas plus grosses ni même plus nombreuses chez les souris *STARD13<sup>-/-</sup>*. On peut donc supposer que la fonction suppresseur de tumeur de STARD13 est compensée par STARD12 chez ces souris. Les souris *STARD13<sup>-/-</sup>* ont également peut-être besoin d'être croisées avec des souris surexprimant un oncogène ou un autre gène suppresseur de tumeur, dans le foie ou un autre organe, pour révéler la fonction suppresseur de tumeur de STARD13.

#### **IV. B. Cancer du sein**

Le niveau d'expression de STARD13 est également souvent dérégulé dans les tumeurs cancéreuses de sein. Plusieurs études ont montré que l'expression de STARD13, au niveau de l'ARNm et protéique, est diminuée dans des tumeurs cancéreuses mammaires comparé au tissu sain (Ullmannova and Popescu 2006). Ullmannova et ses collaborateurs ont même observé que 70% de carcinomes mammaires métastatiques présentaient une diminution de l'expression de l'ARNm de STARD13 (Ullmannova and Popescu 2006). Le rôle de suppresseur de tumeur de STARD13 est suggéré dans la lignée cancéreuse mammaire MDA.MB.231, puisque la diminution de l'expression de STARD13 dans cette lignée réduit leur mort cellulaire et augmente leur prolifération et leur invasion. De manière parallèle, la surexpression de STARD13 dans cette lignée induit, elle, la mort cellulaire (Hanna, Khalil et al. 2014). De plus, STARD13 est également une cible du MicroRNA-125b (miR-125b). Il a été proposé que miR-125b augmente le potentiel métastatique de lignées cancéreuses mammaires, en diminuant notamment l'expression de STARD13, ce qui conforte le rôle de suppresseur de tumeur de STARD13 dans les tumeurs mammaires.

#### **IV. C. Cancer du cerveau**

Le rôle de suppresseur de tumeur de STARD13 a également été suggéré dans les astrocytomes, un type de tumeur gliale (El-Sitt, Khalil et al. 2012). Le niveau d'expression de STARD13 a été comparé entre les différents grades d'astrocytomes, le grade IV étant le plus avancé et le grade I le moins avancé. Le niveau d'expression d'ARNm de STARD13 dans les tumeurs issues des quatre grades est moins élevé que dans les cellules du tissu non tumoral, suggérant que STARD13 a un rôle suppresseur de tumeur dans les tumeurs gliales. La surexpression de STARD13 dans une lignée d'astrocytome inhibe d'ailleurs leur prolifération alors que la diminution de son expression la favorise. Néanmoins, il est intéressant de noter que le niveau d'ARNm de STARD13 est plus élevé dans les grades III et IV que dans les grades I et II, suggérant que le rôle de STARD13 dans la tumorigenèse est peut-être plus complexe qu'il n'y paraît (El-Sitt, Khalil et al. 2012).

#### **IV. D. Cancer du côlon**

Récemment, une étude a également révélé un rôle de suppresseur de tumeur potentiel de STARD13 dans le cancer du côlon (Nasrallah, Saykali et al. 2014). En effet, la surexpression de STARD13 entraîne la diminution de la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses colorectales Caco-2 et HT-29 tandis que la diminution de son expression favorise leur prolifération cellulaire et leur invasion (Nasrallah, Saykali et al. 2014). Plusieurs équipes avaient déjà observé que l'expression l'ARNm de STARD13 était diminuée dans les cancers colorectaux comparé au tissu sain (Ullmannova and Popescu 2006, Gao, Li et al. 2012). De plus, le niveau d'expression de STARD13 est également plus faible dans les tumeurs de patients présentant des métastases ganglionnaires comparés aux patients sans métastases, indiquant un possible rôle anti-métastatique de STARD13 dans les cancers colorectaux (Gao, Li et al. 2012).

Durant ma thèse, je me suis intéressé à l'interaction de STARD13 avec WWP1 et plus particulièrement au rôle de ce complexe sur la stabilité de la GTPase RhoA, protéine envers laquelle STARD13 possède une activité GAP.

## Chapitre 5 : La GTPase RhoA

---

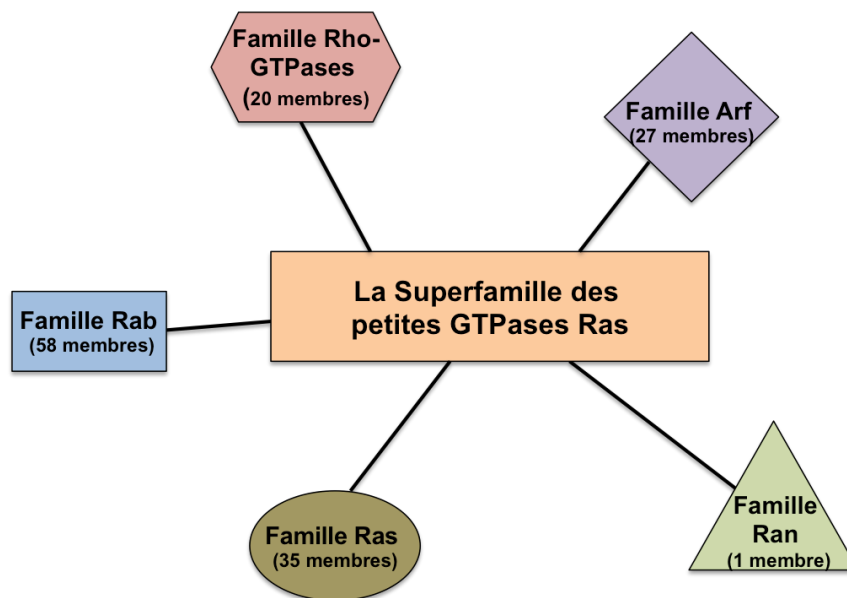
### I. Les GTPases Rho

#### I. A. Classification

RhoA a été identifié en 1985 (Madaule and Axel 1985). RhoA appartient à la famille des GTPases Rho (RhoGTPases). Celle-ci constitue une des cinq grandes familles composant la superfamille Ras de petites GTPases (Guanosine TriPhosphatases), ou GTPases monomériques, les quatre autres grandes familles étant Ras, Arf, Ran et Rab (**Fig.23**).

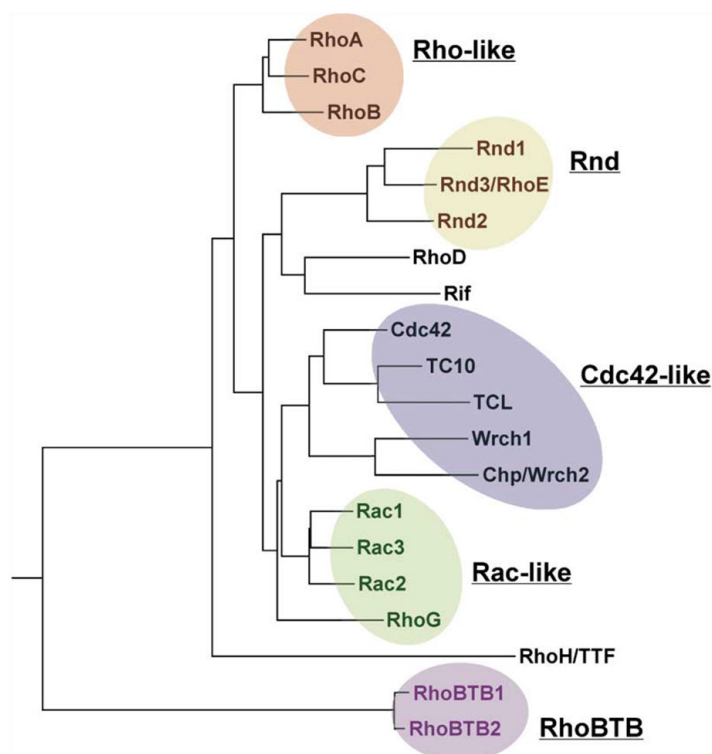
Les RhoGTPases ont été mises en évidence par la suite au début des années 1990 en recherchant des gènes à homologies de séquence avec le gène *Ras*, celui-ci ayant fréquemment des mutations oncogéniques dans les cancers.

La famille des GTPases Rho est composée elle-même de 20 membres chez l'Homme, qui font toutes entre 20 et 25 kDa et dont les mieux caractérisés sont RhoA, Rac1 et Cdc42 (**Fig.24**) (Burridge and Wennerberg 2004, Jaffe and Hall 2005). RhoA forme une sous-famille avec RhoB et RhoC, deux autres protéines très proches dans leur séquence, mais dont les localisations et les fonctions cellulaires sont différentes de RhoA. Les GTPases Rho sont très conservées, de la levure dont le génome compte cinq RhoGTPases potentielles, jusqu'aux mammifères, en passant par la drosophile qui possède une dizaine de RhoGTPases. Il existe plusieurs épissages alternatifs conduisant à des formes épissées des Rho GTPases. Par exemple, le mutant Rac1B, surexprimé dans plusieurs cancers, est un variant de Rac1 qui contient une insertion de 19 acides aminés lui conférant des propriétés oncogéniques (Jordan, Brazao et al. 1999).



**Figure 23: La superfamille Ras**

*La superfamille Ras est composée de plus de 140 petites GTPases réparties en cinq sous-familles, parmi lesquelles se trouve la famille des GTPases Rho.*



**Figure 24 : Les protéines de la famille des RhoGTPases (d'après Burrridge et al, 2004)**

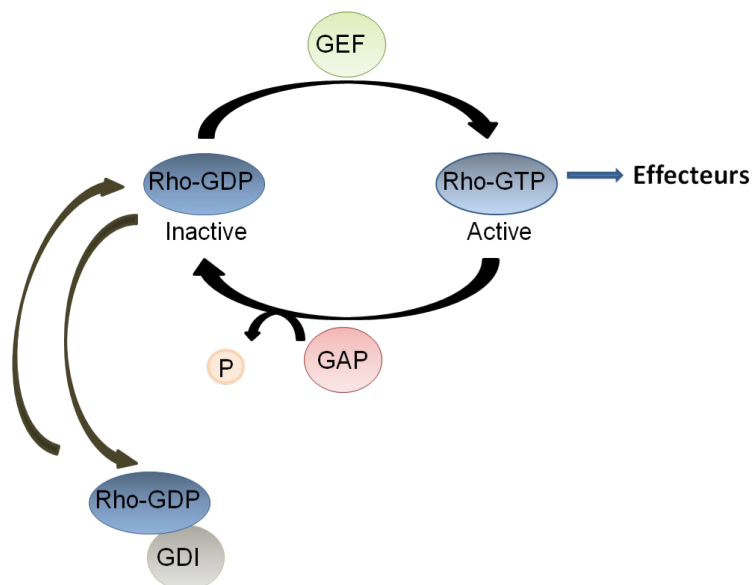
*Les protéines GTPases de la famille Rho sont composées de 20 membres chez l'Homme, réparties en cinq sous-familles plus la protéine RhoH. Les trois membres les mieux caractérisés sont RhoA, Rac1 et Cdc42 (Burrridge and Wennerberg 2004).*

## I. B. Cycle d'activation des RhoGTPases

Les GTPases sont des protéines qui peuvent se lier et hydrolyser le GTP. Elles circulent dans la cellule entre deux états. Elles sont inactives lorsqu'elles sont liées au GDP, et actives lorsqu'elles sont liées au GTP (**Fig 25**) (Hall 1998, Jaffe and Hall 2005). Les petites GTPases correspondent aux sous-unités  $\alpha$  des protéines G hétérotrimériques, mais contrairement à celles-ci, elles fonctionnent de manière autonome.

La prénylation des RhoGTPases permet leur localisation à la membrane plasmique, et est nécessaire mais pas suffisante à leur activation (Bishop and Hall 2000). Cette modification post-traductionnelle consiste en l'addition covalente de groupements farnésyl ou géranylgeranyl sur l'atome de Soufre de la cystéine de la séquence CAAX (ou C représente un résidu cystéine, A est un acide aminé aliphatique et X est l'acide aminé terminal) située à l'extrémité C-terminale des RhoGTPases. Cette fixation est suivie par le clivage des trois acides aminés AAX par la protéase Rce1, ce qui permet à la méthyltransférase Icmt d'ajouter un groupement méthyl au résidu cystéine (Roberts, Mitin et al. 2008).

L'activation et l'inactivation des protéines RhoGTPases sont régulées par deux grandes familles de protéines, les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) et les GAPs (GTPases Activating Proteins) (**Fig.25**). Les GEFs favorisent l'échange du GDP lié aux GTPases en GTP. Elles induisent ainsi l'activation des protéines RhoGTPases par un changement de conformation de ces protéines qui peuvent alors s'associer à différents effecteurs (**cf. Chapitre 5/ IV. C. 2**) (Cerione and Zheng 1996). Au contraire les GAPs sont capables d'augmenter l'activité GTPasique intrinsèque des RhoGTPases, ce qui entraîne leur inactivation (**cf. Chapitre 5/ IV. C. 1**). Lorsqu'elles sont liées au GDP, les protéines RhoGTPases peuvent aussi s'associer à des protéines chaperonnes du cytosol, les RhoGDI (Guanine-nucleotide Dissociation Inhibitor), qui les séquestrent au niveau du cytosol et les maintiennent ainsi sous leur forme inactive (Fukumoto, Kaibuchi et al. 1990) (**cf. Chapitre 5/ IV. C. 3**).



**Figure 25 : Cycle d'activation et d'inactivation des RhoGTPases**

*Les RhoGTPases oscillent entre deux états dans la cellule, actives liées au GTP et inactives liées au GDP. Ces deux états sont régulés par les protéines RhoGEFs et RhoGAPs. Lorsqu'elles sont liées au GDP, les RhoGTPases peuvent interagir avec les protéines RhoGDIs qui les séquestrent dans le cytoplasme.*

## I. C. Fonctions des RhoGTPases

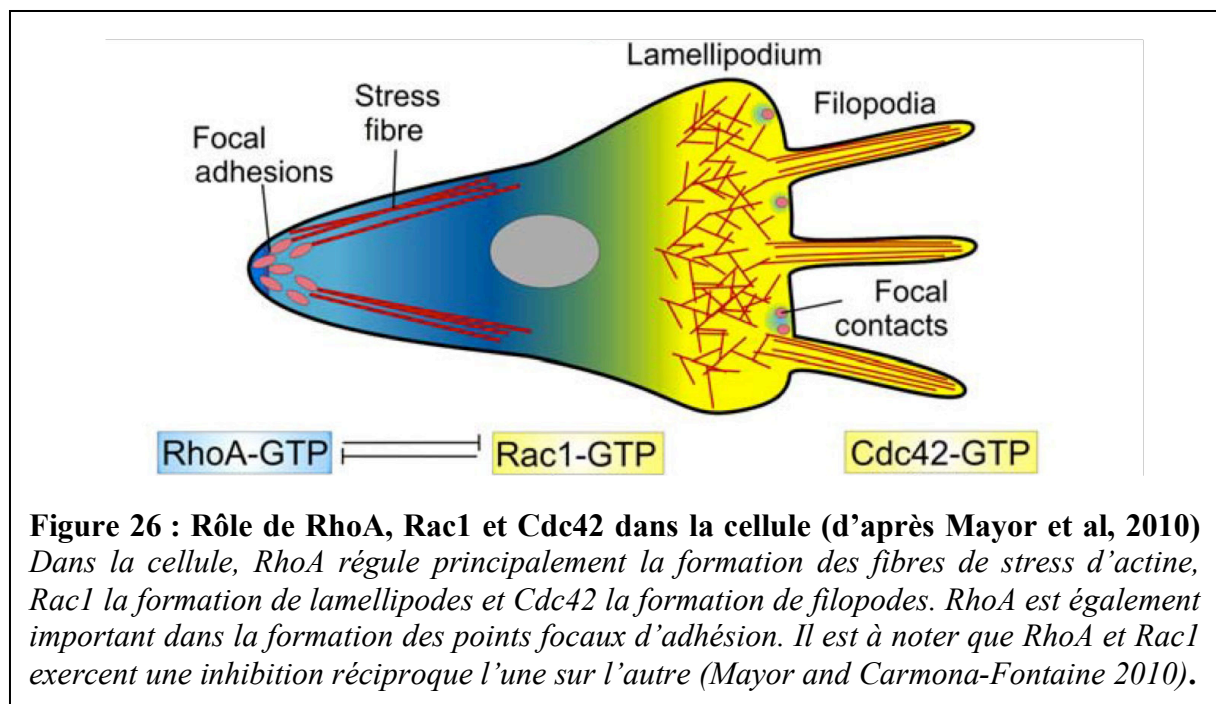
Il existe plus d'une centaine d'effecteurs identifiés à ce jour pour les GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42. Ces effecteurs sont aussi bien des kinases (serine/threonine kinase ou tyrosine kinase) comme par exemple les protéines ROCKs ou PAKs, des lipases comme la phospholipase D (PLD) ou des adaptateurs comme les protéines Rhotekin ou WASPs (Wiskott-Alrich Syndrome Proteins).

Un des principaux rôles des RhoGTPases est l'organisation du cytosquelette d'actine. RhoA, Rac1 et Cdc42 ajustent la polymérisation de l'actine pour entraîner la formation, respectivement, de fibres de stress, de lamellipodes et de filopodes (**Fig.26**) (Etienne-Manneville and Hall 2002). En régulant ainsi le cytosquelette d'actine, les RhoGTPases interviennent dans la régulation de nombreux processus cellulaires comme l'adhésion ou encore la migration (**cf. Chapitre 5/ III.**). RhoA induit spécifiquement la formation de fibres de stress d'actine dans la cellule, ce qui est notamment nécessaire à la morphogenèse de la cellule. Cdc42 est nécessaire à la polarité des cellules. Cdc42 agit notamment avec la protéine



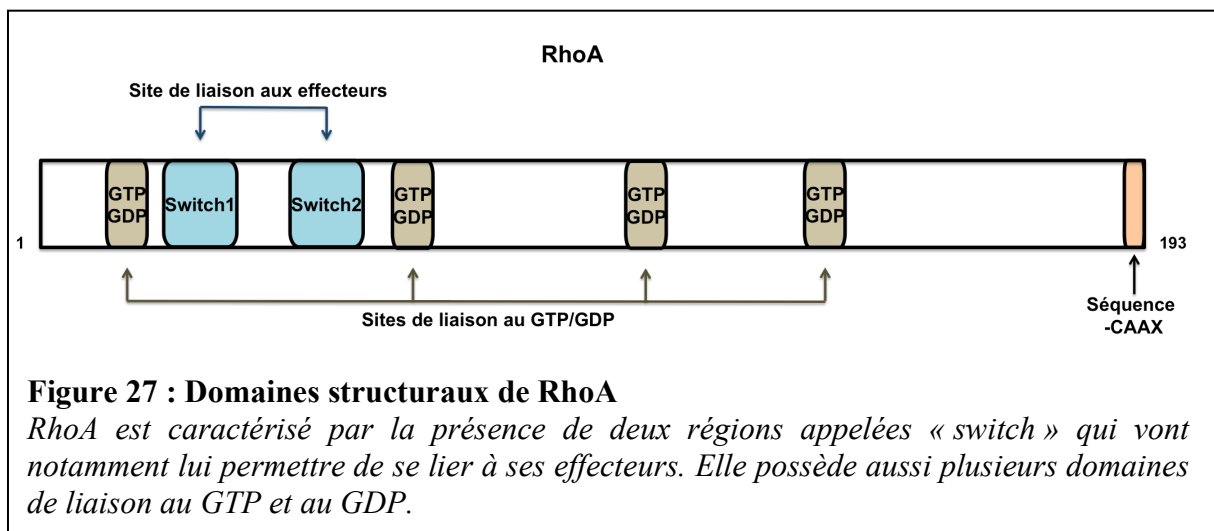
Par6 et la kinase PKC-3 pour induire la polarité des cellules épithéliales (Bishop and Hall 2000). Le rôle des trois RhoGTPases est également primordial pour le mouvement des cellules. Pour assurer leur migration, les cellules émettent des protrusions à l'avant qui nécessite la polymérisation de filaments d'actine sous forme de filopodes, régulés par Cdc42. Ensuite, la contraction de filaments d'acto-myosine à l'arrière, permise par RhoA, est nécessaire au mouvement de la cellule. Dans ce mécanisme, Rac1 est nécessaire à l'avant de la cellule. Grâce à la formation de lamellipodes, Rac1 va permettre aux cellules de former des protrusions et migrer vers l'avant (Jaffe and Hall 2005). Ceci se fait principalement *via* les protéines WAVE (WASP-family verprolin-homologous protein) et Arp2/3. De manière complémentaire, Cdc42 apparaît aussi comme nécessaire pour contrôler la direction du mouvement cellulaire, en régulant entre autre la localisation de l'activation de Rac1 à l'avant de la cellule. Il est intéressant de noter que RhoA et Rac1 exercent une inhibition réciproque l'un sur l'autre..

En plus de leur rôle sur le cytosquelette, il est maintenant admis que les RhoGTPases régulent aussi d'autres processus cellulaires comme l'expression de gènes, notamment par leur action sur le facteur de transcription SRF (Serum Response Factor), mais aussi la prolifération cellulaire, en agissant sur le cycle cellulaire, ou encore l'apoptose (Jaffe and Hall 2005).



## II. Structure de RhoA

Les structures cristallographiques de RhoA liée au GTP et de RhoA liée au GDP ont été résolues et révèlent que les différences entre les deux structures sont très faibles (Ihara, Muraguchi et al. 1998). Néanmoins, il semble que deux boucles de surface, nommées « switch » I et II, soient distinctes, suivant que RhoA soit liée au GDP ou au GTP, et que cela soit ces régions qui permettent à RhoA de se lier ou non à ses effecteurs (**Fig.27**). C'est également en interagissant avec les régions « switch » des RhoGTPases que les RhoGDI les maintiennent dans un état inactif (**cf. Chapitre 5/ IV. C. 3**). Les RhoGTPases peuvent néanmoins interagir avec certains de leurs partenaires grâce à d'autres régions que celles de ces deux régions « switch » (Wei, Zhang et al. 1997, Ihara, Muraguchi et al. 1998).

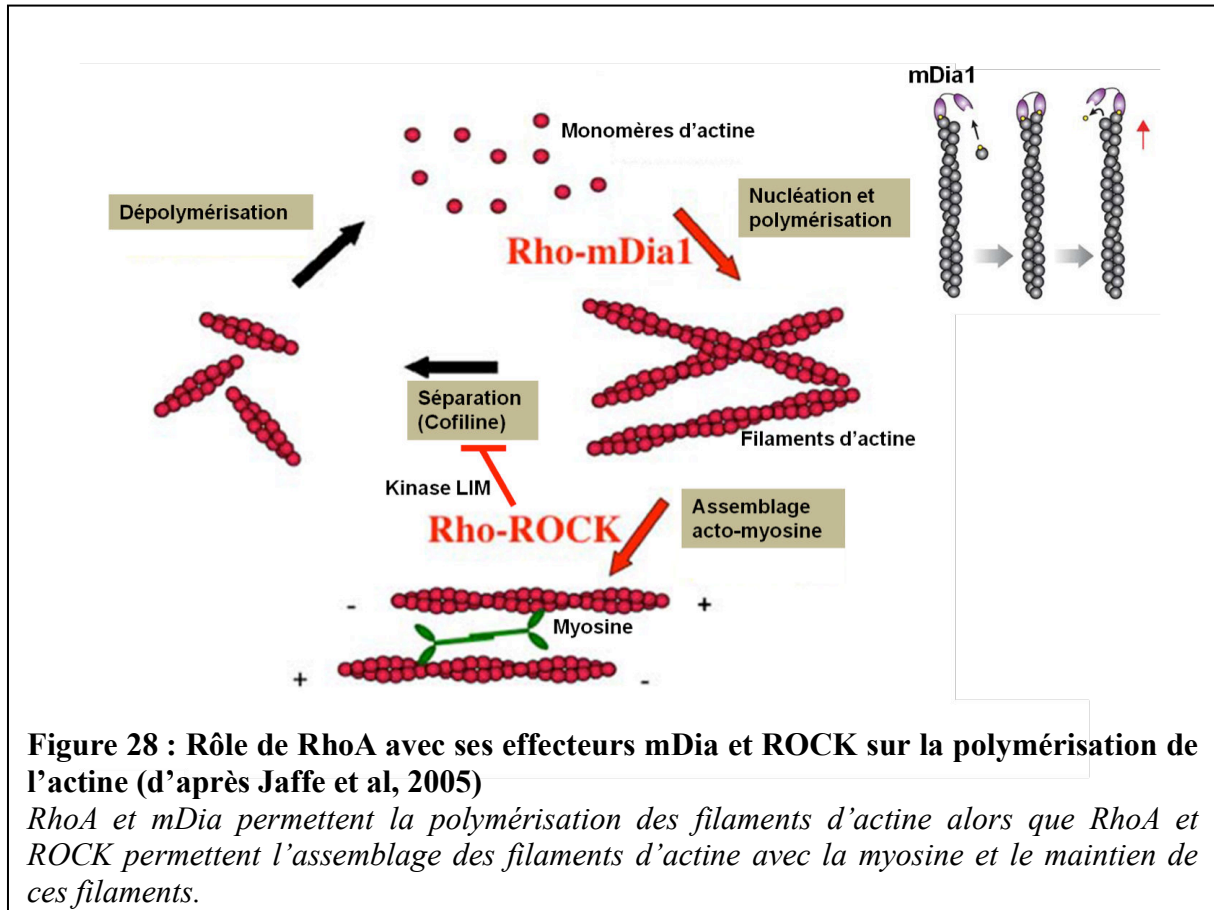


## III. Fonctions de RhoA

### III. A. Régulation du cytosquelette d'actine

La GTPase RhoA est un régulateur majeur du cytosquelette d'actine. RhoA induit en particulier la formation de fibres de stress d'actine. Les fibres de stress d'actine sont composées d'une dizaine à une trentaine de filaments d'actines polarisés, maintenus parallèles et serrés entre eux par l' $\alpha$ -actinine. Ces filaments sont également associés à des protéines de myosine, qui permettent la contraction de ces filaments.

RhoA agit sur l'actine principalement par l'intermédiaire de deux effecteurs : mDia1 (mammalian homolog of drosophila Diaphaneus 1) et ROCK (Rho-associated Coiled-coil forming Kinase) (**Fig.28**) (Narumiya, Tanji et al. 2009). L'activité de RhoA sur les filaments d'actine lui confère un rôle important lors des processus développementaux, mais également lors de la cancérogenèse.

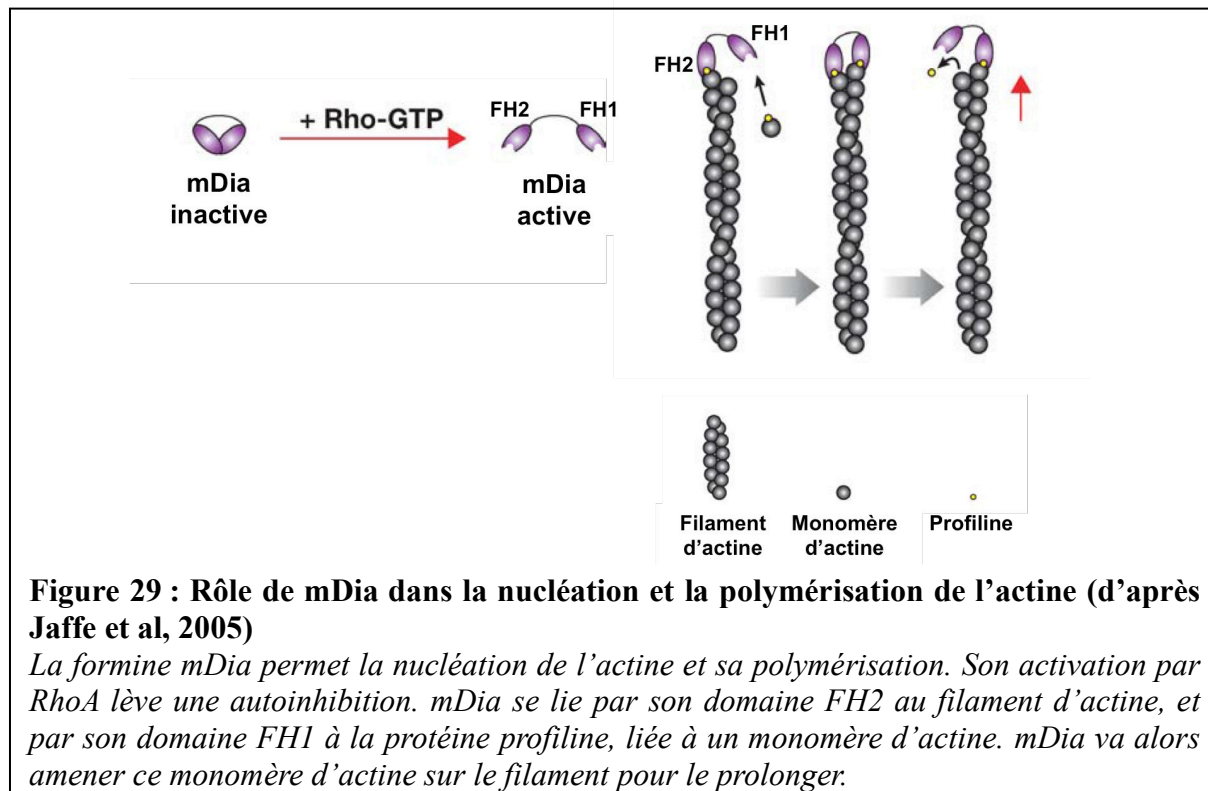


### III. A. 1. mDia1

La première étape de la formation des filaments d'actine est la nucléation, où des monomères d'actine, appelés actine-G pour actine globulaire, vont se regrouper pour former principalement des trimères. Suite à cette étape, qui est très lente, d'autres monomères d'actine vont être ajoutés pour former le filament, c'est l'étape de polymérisation.

mDia1 est une protéine de la famille des formines qui permet la nucléation et la polymérisation de l'actine. La liaison de mDia1 avec RhoA activé lève une interaction intramoléculaire de mDia qui est responsable de son autoinhibition (**Fig.29**). Un des deux domaines FH (Formin Homology) de mDia1, le domaine FH2, peut alors se lier à l'extrémité

positive du filament d'actine. Le second domaine FH de mDia1, le domaine FH1, va lui interagir avec une protéine profiline, qui permet l'échange d'ADP lié à l'actine en ATP, ce qui va activer l'actine-G. En se liant à la profiline liée à un monomère d'actine, mDia va pouvoir apporter ce monomère d'actine-G à l'extrémité du filament d'actine (Jaffe and Hall 2005, Narumiya, Tanji et al. 2009 ). La protéine mDia1, liée à l'extrémité du filament d'actine, reste localisée à cet endroit et permet la fixation successive de plusieurs monomères au filament d'actine en formation (**Fig.29**).

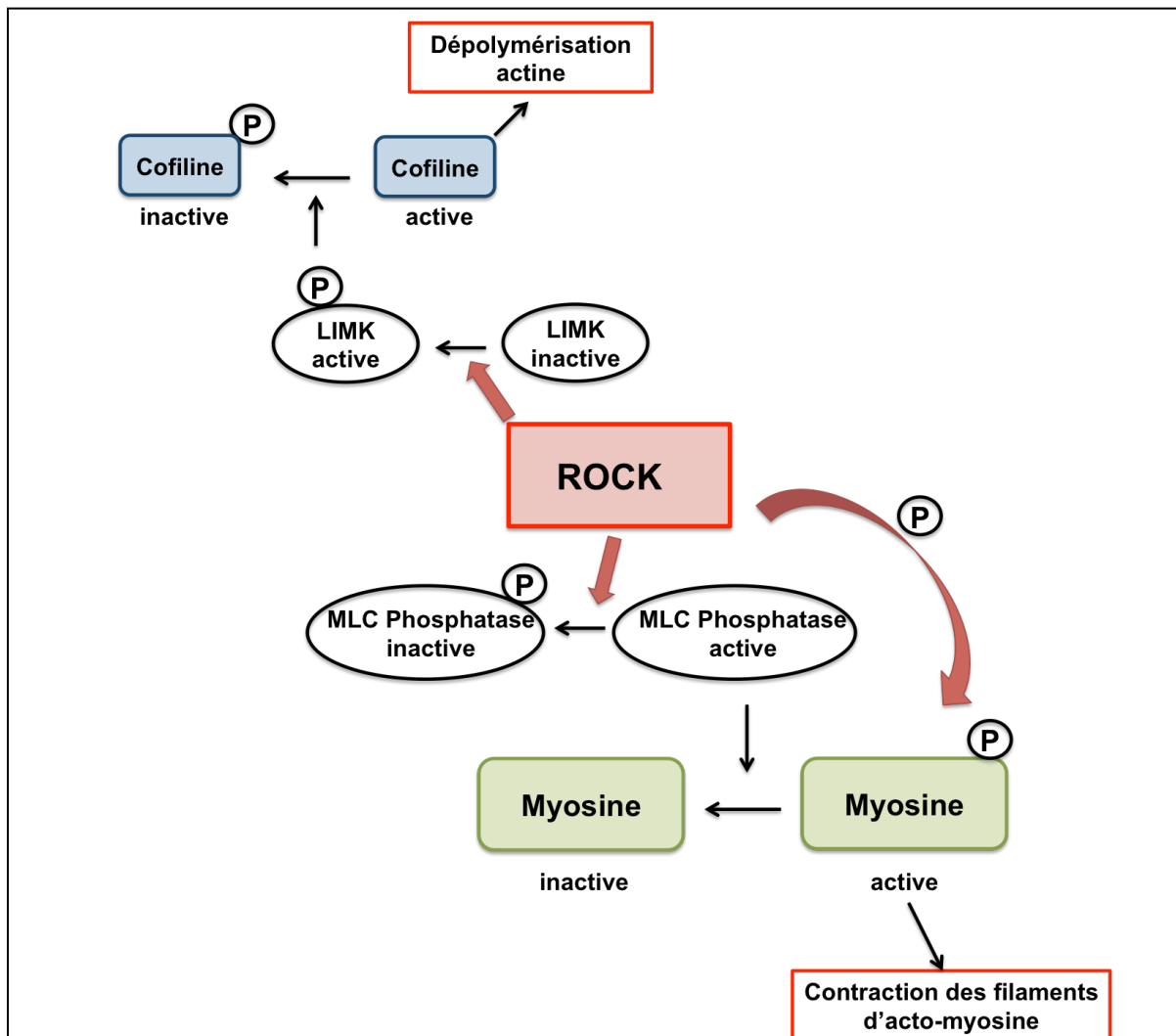


### III. A. 2. ROCK

La serine/thréonine kinase ROCK est un des effecteurs majeurs de RhoA (**Fig.30**). L'un des principaux substrats de ROCK est la phosphatase des chaînes légères de myosine (MLC). La myosine est en effet constituée de deux chaînes lourdes ainsi que de quatre chaînes légères. L'activité de la myosine est dépendante de la phosphorylation de ces MLC. La phosphatase des MLC est phosphorylée par ROCK, ce qui entraîne son inhibition. Les chaînes légères de myosine restent alors phosphorylées et interagissent avec l'actine. Cette association va alors stimuler l'activité ATPase de la myosine et permettre la contractilité des filaments d'acto-myosine. ROCK peut aussi directement phosphoryler les chaînes légères de myosine, et

augmente ainsi l'activité de la myosine (**Fig.30**) (Narumiya, Tanji et al. 2009). Il est à noter que ce rôle de ROCK sur les chaînes légères de la myosine est également essentiel dans la maturation des points focaux d'adhésion.

De plus, ROCK phosphoryle et active également les kinases LIM (LIMK). Ces sérine/thréonine kinases sont impliquées dans la dynamique des filaments d'actine. Les LIMK phosphorylent et inactivent la protéine cofiline, qui en se liant à l'actine, favorise sa dépolymérisation. La phosphorylation des kinases LIM par ROCK permet ainsi la stabilisation et le maintien des filaments d'actine polymérisés (**Fig.30**) (Narumiya, Tanji et al. 2009).



**Figure 30 : Rôle de ROCK dans le maintien et la contraction des filaments d'actine**  
*RhoA et ROCK permettent la contraction des filaments d'actine en phosphorylant les chaînes légères de la myosine (MLC). Pour cela, ROCK phosphoryle la MLC phosphatase pour l'inactiver et phosphoryle aussi directement les MLC. RhoA et ROCK permettent également le maintien des filaments d'actine en phosphorylant les kinases LIM (LIMK), qui vont phosphoryler et inactiver la cofiline, responsable de la dépolymérisation de l'actine.*

### **III. B. Régulation de la migration cellulaire**

Il a longtemps été considéré que RhoA n'était pas nécessaire pour la migration cellulaire, mais il apparaît aujourd'hui que RhoA joue en réalité un rôle important dans ce processus (Vega, Fruhwirth et al. 2011, Zegers and Friedl 2014). Notamment, la modulation des filaments d'actine est très importante pour la migration cellulaire.

Il a également longtemps été décrit que RhoA était actif uniquement à l'arrière de la cellule, pour permettre la polymérisation et la contraction des filaments d'acto-myosine, par ses effecteurs mDia et ROCK. En utilisant des bio-senseurs basés sur la fluorescence, il a été montré que RhoA était aussi actif à l'avant de la cellule. Ainsi, RhoA est actif au niveau de la membrane à l'avant des cellules en migration pour former des lamellipodes et le « ruffling » des membranes, *via* son effecteur ROCK (O'Connor and Chen 2013). Cette activation de RhoA à l'avant de la cellule se fait avant l'activation de Rac1 et Cdc42, l'activation des trois RhoGTPases étant contrôlés dans le temps.

De plus, la perte d'adhésion des intégrines au niveau des points d'adhésion au substrat sont nécessaires à la migration de la cellule. RhoA va agir *via* ROCK pour permettre la maturation des points focaux d'adhésion puis avec mDia1 pour permettre leur dissolution et la migration. En effet, la diminution de l'expression de mDia1 par siRNA réduit le turnover des points d'adhésion focaux, limitant la migration (Yamana, Arakawa et al. 2006).

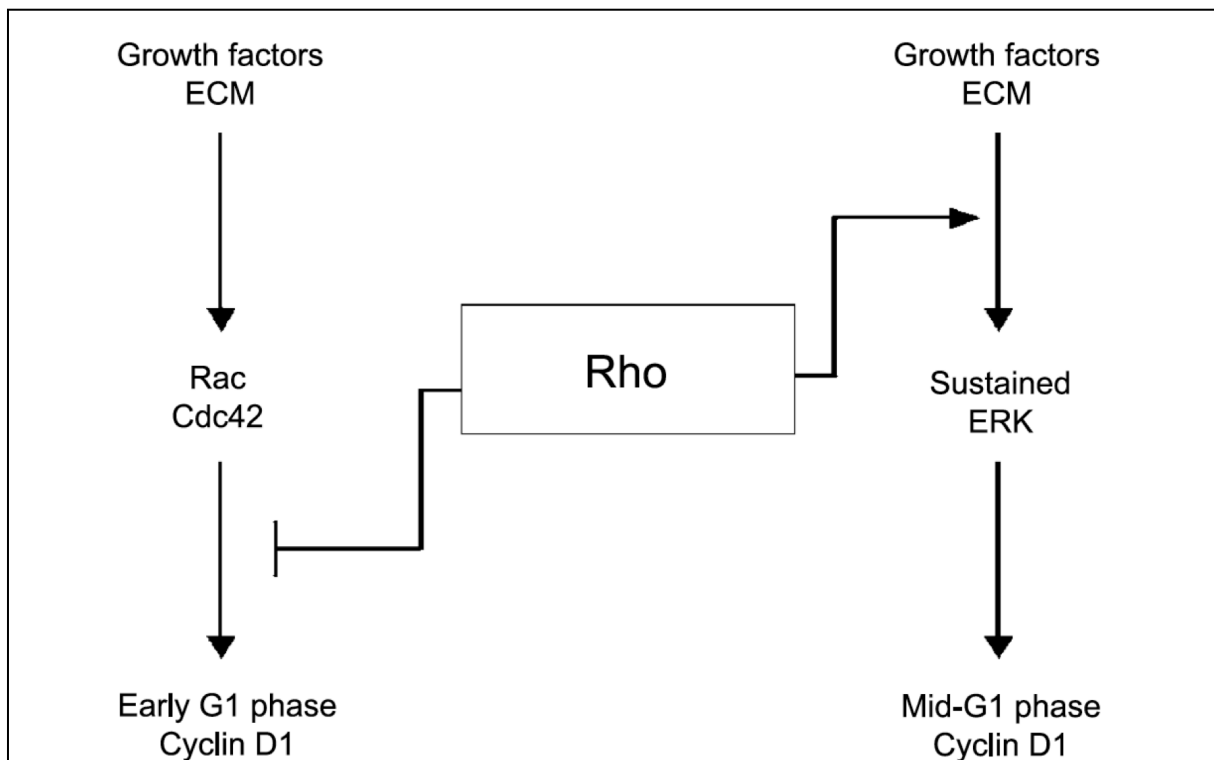
### **III. C. Régulation du cycle cellulaire**

L'activité de la GTPase RhoA est également importante pour la bonne progression du cycle cellulaire. En effet, elle joue un rôle lors de la phase G1, en agissant sur la régulation des cyclines dépendantes kinases (Cdk) et ses inhibiteurs, ainsi que lors de la mitose en agissant sur les microtubules et le cytosquelette d'actine.

### III. C. 1. Phase G1

La progression dans la phase G1 du cycle cellulaire est principalement régulée par les cyclines-dépendantes kinases Cdk4, Cdk6 et Cdk2. Ces Cdk sont activées en se liant à la Cycline D pour Cdk4 et Cdk6 et à la Cycline E pour Cdk2, et inactivées par les protéines Cip/Kip (CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein) (comme p21<sup>cip1</sup> et p27<sup>kip1</sup>) ou encore les protéines INK4A/ARF (Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinase).

Il a été montré que RhoA régule principalement la Cycline D. RhoA permet l'expression de la Cycline D au moment correct du cycle cellulaire, c'est-à-dire au milieu de la phase G1, en permettant une activation de la voie ERK grâce à son effecteur ROCK et LIMK, et en inhibant Rac1 et Cdc42 (**Fig.31**) (Welsh 2004). RhoA régule également cette phase G1 du cycle cellulaire en inhibant deux protéines inhibitrices de Cdk2 p21<sup>cip1</sup> et p27<sup>kip1</sup>, ainsi que les inhibiteurs de Cdk4 et Cdk6 de la famille INK4A, p15, p16, p18 et p19, (Jaffe and Hall 2005, Zhang, Tang et al. 2009).



**Figure 31 : Rôle de RhoA lors de la phase G1 du cycle cellulaire (d'après Welsh, 2004)**

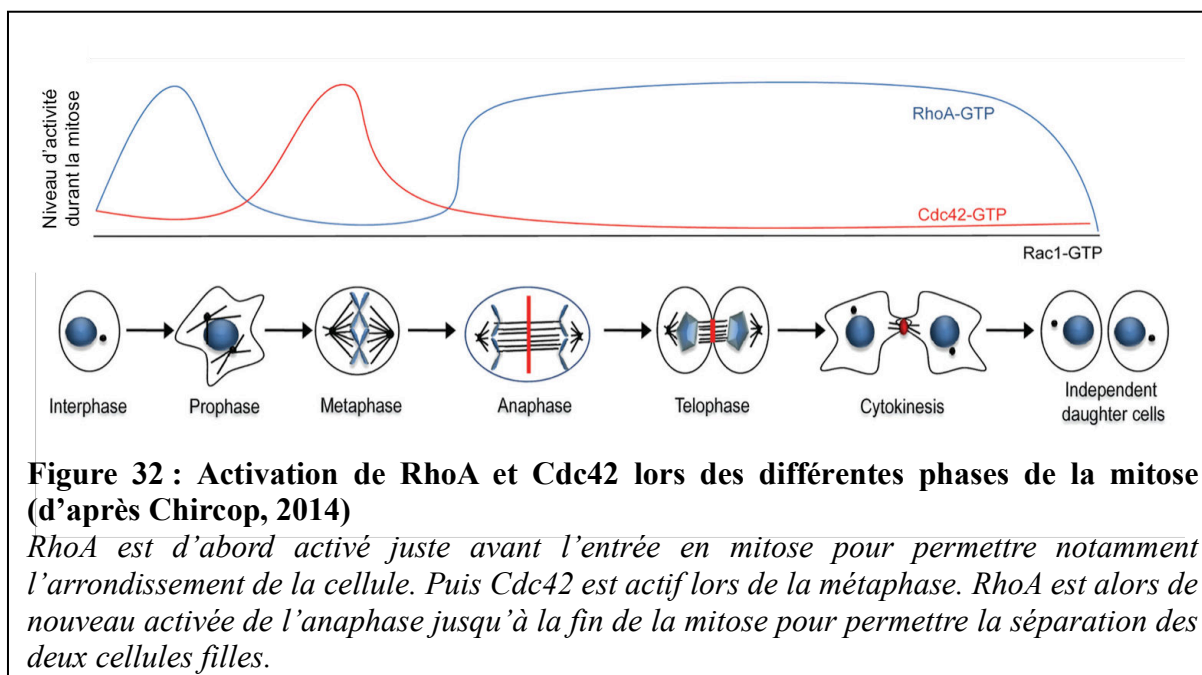
*RhoA permet l'activation de la cycline D au bon moment de la phase G1, c'est-à-dire au milieu de cette phase, grâce à l'activation de la kinase ERK.*

### III. C. 2. Mitose

Les protéines de la famille RhoGTPases participent également au bon fonctionnement de la mitose, en agissant séquentiellement lors de ses différentes phases (**Fig.32**).

La première RhoGTPase activée est RhoA, juste avant l'entrée en prophase. RhoA est active au niveau du cortex cellulaire et permet à la cellule de s'arrondir notamment grâce à son effecteur ROCK et son rôle sur le cytosquelette d'actine.

Lors de la métaphase, c'est l'activité de Cdc42 qui est augmentée. RhoA est ensuite de nouveau activée à partir de l'anaphase jusqu'à la séparation des deux cellules filles. RhoA va notamment activer son effecteur mDia1 au niveau équatorial du cortex cellulaire, ce qui va permettre la polymérisation des filaments d'actine. En activant les kinases ROCK et Citron, va permettre à la myosine de contracter les filaments d'actine. RhoA entraîne ainsi la formation de l'anneau contractile permettant aux deux cellules filles de se séparer, à la fin de la mitose (Chircop 2014).



### III. D. Régulation de l'expression génique

Il a été montré que RhoA pouvait aussi réguler l'expression génique. En induisant la polymérisation de l'actine, RhoA stimule en effet la translocation nucléaire de la protéine MAL (Megakaryocytic Acute Leukemia). MAL, un co-activateur du facteur de transcription



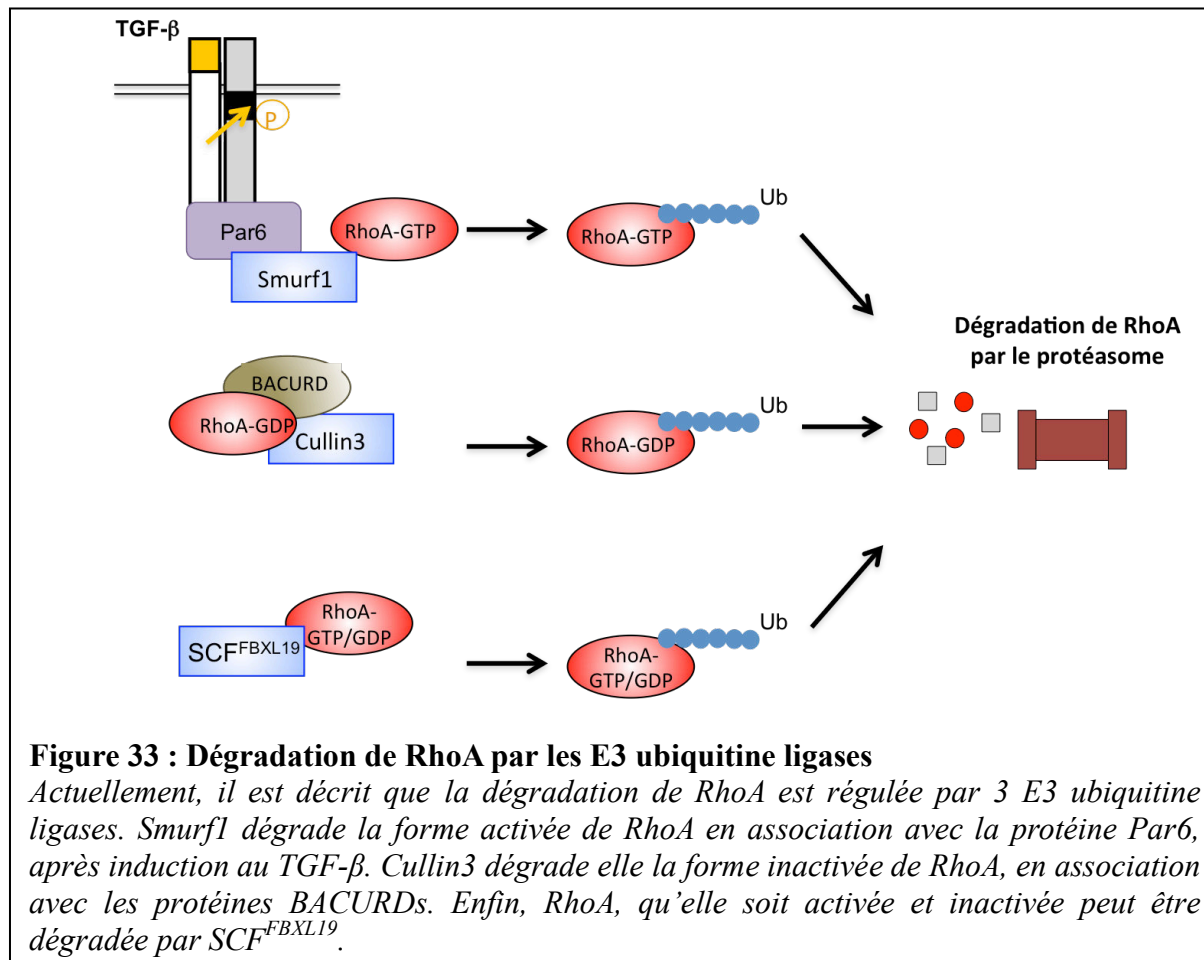
SRF (Serum Response Factor) qui se lie aux séquences d'ADN SRE (Serum Response Element), va alors activer la transcription de gènes, comme par exemple *vinculin* ou *SRF* lui-même (Miralles, Posern et al. 2003). Mais la polymérisation de l'actine par RhoA peut aussi réprimer l'expression génique. RhoA inhibe par exemple l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription Sox9 (Kumar and Lassar 2009).

## **IV. Régulation de la GTPase RhoA**

La GTPase RhoA étant impliquée dans des fonctions cellulaires cruciales, son activité est finement contrôlée dans la cellule. La régulation de RhoA s'effectue à plusieurs niveaux. Tout d'abord le niveau protéique total de RhoA est contrôlé par des E3 ubiquitine ligases, qui en polyubiquitinant RhoA, vont induire sa dégradation. La phosphorylation ou déphosphorylation de RhoA permettent également de réguler sa stabilité. Enfin, la régulation de RhoA peut également s'exercer directement au niveau de son activité GTPasique par plusieurs familles de protéines, les RhoGEFs, les RhoGAPs et les RhoGDIs.

### **IV. A. Régulation de RhoA par le système Ubiquitine-Protéasome**

La polyubiquitination de la GTPase RhoA est un des mécanismes qui permet de réguler sa stabilité. Jusqu'à présent, trois E3 ubiquitine ligases ont été décrites dans la littérature comme induisant la polyubiquitination de RhoA et sa dégradation par le protéasome. Il s'agit de la E3 ubiquitine ligase à domaine HECT Smurf1 et des E3 ubiquitine ligases à domaine RING Cullin3 et SCF<sup>FBXL19</sup> (**Fig.33**).

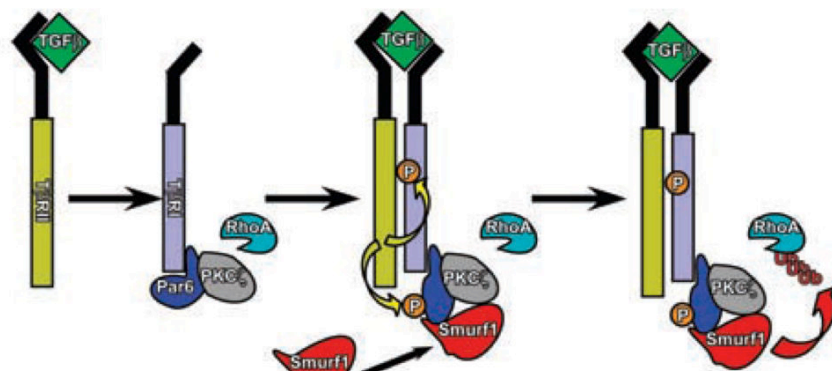


#### IV. A. 1. Smurf1

Smurf1 a été la première E3 ubiquitine ligase identifiée comme ciblant RhoA pour entraîner son ubiquitination et sa dégradation (Wang, Zhang et al. 2003). Smurf1 avait été initialement décrite comme une E3 ubiquitine ligase capable d'inhiber la signalisation TGF-β en induisant la polyubiquitination et la dégradation de TβRI (**cf. Chapitre 1/ I. B. 3.**). Les conséquences de la surexpression de Smurf1 ou sa diminution par transfection de siRNA ont été étudiées, dans les cellules pulmonaires de vison Mv1Lu et les cellules embryonnaires de rein HEK293T. De manière intéressante, la surexpression de Smurf1 entraîne la formation de protrusions cellulaires et la perte de polarité des cellules. Au contraire, la réduction de l'expression de Smurf1 conduit à la perte de protrusions cellulaires. Ces observations semblaient indiquer un rôle de Smurf1 envers une RhoGTPase. Wang et ses collaborateurs ont montré qu'en effet Smurf1 est capable de polyubiquitiner RhoA *in vitro* et *in vivo* sur ses

résidus lysines K6 et K7 et cette polyubiquitination entraîne la dégradation de RhoA par le protéasome (Wang, Zhang et al. 2003, Ozdamar, Bose et al. 2005). De manière intéressante, la diminution de l'expression de Smurf1 par siRNA n'a cependant pas d'effet sur le niveau protéique total de RhoA. Les auteurs de cette étude montrent que la dégradation de RhoA par Smurf1 se fait de manière localisée au niveau des complexes de polarité, où RhoA colocalise avec la protéine PKC. Ceci pourrait expliquer que seulement une petite fraction de RhoA est dégradée par Smurf1 dans la cellule. Boyer et ses collaborateurs suggèrent, eux, que Smurf1 dégrade la forme activée de RhoA, liée au GTP. En effet, ils montrent que l'inactivation du gène *Smurf1* dans des cellules MEF empêche la dégradation de la forme activée de RhoA induite par la toxine CNF1 (Cytotoxic Necrotising Factor 1) (Boyer, Turchi et al. 2006). De manière cohérente, l'expression de Smurf1 empêche la formation de fibres de stress induites par cette toxine CNF1.

En dégradant RhoA, il semble que Smurf1 participe à la TEM induite par le TGF- $\beta$ . RhoA est en effet activée par le TGF- $\beta$  lors de l'initiation de la TEM (Bhowmick, Ghiassi et al. 2001). Cependant, le TGF- $\beta$  induit également la dégradation de RhoA, nécessaire à la dissolution des jonctions cellules-cellules lors de la TEM. Il a été montré que le récepteur T $\beta$ RII, activé par le TGF- $\beta$ , interagit avec la protéine adaptatrice Par6 et la phosphoryle. Cette phosphorylation de Par6 par T $\beta$ RII sur son résidu serine 435 lui permet de se lier et recruter Smurf1 à la membrane. Smurf1 peut alors polyubiquitiner RhoA, ce qui conduit à sa dégradation, à la dissolution des jonctions cellules-cellules et à la TEM. La dégradation de RhoA induite par le TGF- $\beta$  peut être reversée par un mutant de Par6 (Par6S435A), non phosphorylable par T $\beta$ RII, indiquant que Par6 est nécessaire à la dégradation de RhoA par le TGF- $\beta$  (**Fig.34**) (Ozdamar, Bose et al. 2005).



**Figure 34 : La dégradation de RhoA par Smurf1 est dépendante de Par6 (d'après Ozdamar et al, 2005)**

*Après induction par le TGF- $\beta$ , T $\beta$ RII peut phosphoryler Par6, ce qui va permettre le recrutement de Smurf1 à la membrane. Smurf1 peut alors polyubiquitiner RhoA, induisant sa dégradation.*

#### IV. A. 2. Cullin3

Cullin3 fut la deuxième E3 ubiquitine ligase identifiée comme dégradant RhoA (Chen, Yang et al. 2009). Cullin3 est une E3 ubiquitine ligase de la famille RING. C'est le complexe protéique qu'elle forme avec les protéines adaptatrices BACURDs qui lui permet de polyubiquitiner et dégrader RhoA. Contrairement à ce qui est observé pour Smurf1, la diminution de l'expression de Cullin3 et des protéines BACURDs entraîne une hausse du niveau protéique de RhoA. Cela peut s'expliquer par le fait que la Cullin3 semble interagir et dégrader la forme inactive de RhoA (liée au GDP). D'un point de vue fonctionnel, la réduction de l'expression de Cullin3 ou BACURDs par transfection de siRNA entraîne la formation de fibres de stress dans les cellules épithéliales cancéreuses HeLa, ce qui est cohérent avec une augmentation du niveau protéique de RhoA.

#### IV. A. 3. SCF<sup>FBXL19</sup>

Plus récemment, les travaux de Wei et ses collaborateurs ont décrit une nouvelle E3 ubiquitine ligase capable de polyubiquitiner et dégrader RhoA (Wei, Mialki et al. 2013). Cette E3 ubiquitine ligase, Skp1-Cul1-F-box (SCF<sup>FBXL19</sup>), appartient à la grande famille des complexes de E3 ligases SCF, elle-même faisant partie des E3 ligases à domaine catalytique RING. SCF<sup>FBXL19</sup> polyubiquitine RhoA sur son résidu lysine K135, ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome. En revanche, contrairement à Smurf1 et Cullin3 qui ciblent respectivement les formes activées et inactivées de RhoA, il semble que SCF<sup>FBXL19</sup> soit

capable de polyubiquitiner RhoA indifféremment de son état d'activation. De plus, SCF<sup>FBXL19</sup> peut aussi polyubiquitiner et entraîner la dégradation de la RhoGTPase Rac1, (également sous sa forme active et inactive) (Zhao, Mialki et al. 2013), suggérant que l'effet de SCF<sup>FBXL19</sup> n'est pas aussi spécifique que l'action que peuvent avoir Smurf1 et Cullin3 sur RhoA.

D'un point de vue fonctionnel, la dégradation de RhoA causée par SCF<sup>FBXL19</sup> entraîne une diminution de la prolifération. En effet, la surexpression de SCF<sup>FBXL19</sup> diminue la prolifération de la lignée cellulaire épithéliale de poumon de souris MLE12. Cet effet est reversé si RhoA, ou la forme mutée RhoA.K135R, qui n'est pas ubiquitinée par SCF<sup>FBXL19</sup>, sont co-transfectés avec SCF<sup>FBXL19</sup>. SCF<sup>FBXL19</sup> réduit également la formation de fibres de stress, dans les cellules MLE12, induites par traitement au LysoPhosphatidic Acid (LPA). SCF<sup>FBXL19</sup> entraîne donc une inhibition de l'action de RhoA sur le cytosquelette d'actine et la prolifération cellulaire.

L'identification de ces trois E3 ubiquitine ligases, de familles différentes, et ciblant la forme activée ou inactivée de RhoA, indique que plusieurs E3 ubiquitine ligases peuvent se partager la régulation de la dégradation spatio-temporelle de RhoA et révèle ainsi la complexité de la régulation de RhoA par le système ubiquitine-protéasome.

#### **IV. B. Régulation de RhoA par phosphorylation**

RhoA est également soumise à des phosphorylations qui permettent de réguler sa stabilité. Les protéines kinases A (PKA) et G (PKG) peuvent phosphoryler RhoA sur son résidu sérine 188 (Lang, Gesbert et al. 1996, Sauzeau, Le Jeune et al. 2000). Cette phosphorylation de RhoA entraîne une augmentation de sa stabilité due à une inhibition de sa polyubiquitination. En effet, le mutant RhoA.S188E, constitutivement phosphorylé, est moins polyubiquitiné et plus stable. Ceci est particulièrement évident pour la forme constitutivement activée de RhoA, RhoA.Q63L, qui devient beaucoup plus stable lorsqu'elle est mutée sur son résidu sérine188. De manière surprenante, ces mutants RhoA.WT.S188E et RhoA.Q63L.S188E sont localisés dans le cytoplasme, alors que la forme constitutivement activée RhoA.Q63L est normalement localisée à la membrane. Rolli-Derkinderen et ses collaborateurs ont en effet montré que la phosphorylation de RhoA sur son résidu S188 permet à RhoA de s'associer aux protéines RhoGDIs, ce qui entraîne la séquestration de RhoA dans le cytoplasme. Ceci a pour conséquence d'inhiber la polyubiquitination de la forme activée de RhoA et sa dégradation par le protéasome (Rolli-Derkinderen, Sauzeau et al. 2005).

Inversement, la polyubiquitination et la dégradation de RhoA sont favorisées lorsque RhoA est phosphorylée par la kinase Erk2 sur des résidus sérine. De fait, l'inhibiteur de la signalisation ERK, le PD98059, conduit à la stabilisation de RhoA (Wei, Mialki et al. 2013). Il semble donc que les phosphorylations de RhoA puissent inhiber, mais également activer sa dégradation, selon le signal de phosphorylation de RhoA.

#### **IV. C. Régulation de RhoA par les protéines RhoGAPs, GEFs et GDIs**

Les protéines RhoGTPases cyclent entre deux états dans la cellule, activées liées au GTP et inactives liées au GDP. Le passage entre ces deux états est régulé par deux grandes familles de protéines, les RhoGAPs et les RhoGEFs. A l'état inactif, les GTPases Rho sont séquestrées dans le cytoplasme par une autre famille de protéines, les RhoGDIs (**Fig.25**).

##### **IV. C. 1. Les protéines RhoGAPs**

Les RhoGAPs accélèrent l'hydrolyse du GTP en GDP des GTPases RhoA en stimulant leur activité GTPasique intrinsèque et inhibent donc leur activité.

##### **IV. C. 1. a. Généralités**

Ces RhoGAPs sont caractérisées par leur domaine GAP, un domaine de 150 acides aminés, composé de 9 hélices  $\alpha$  et qui contient un résidu arginine conservé dans une structure en boucle. Le domaine GAP interagit notamment avec les régions « switch I » et « switch II » des RhoGTPases et permet d'augmenter l'efficacité du taux intrinsèque d'hydrolyse des RhoGTPases (**cf. Chapitre 5/ II.**)

Le génome humain compte à lui seul entre 60 et 70 RhoGAPs dont environ la moitié a été bien caractérisée. Ces RhoGAPs peuvent être spécifiques de certaines RhoGTPases. Il existe donc environ trois fois plus de RhoGAPs que de RhoGTPases, ce qui pourrait laisser penser que leur rôle est redondant dans la cellule (Tcherkezian and Lamarche-Vane 2007).

En réalité, les RhoGAPs peuvent aussi agir comme des adaptateurs entre les RhoGTPases et d'autres partenaires. En effet, la plupart des RhoGAPs ne possèdent pas uniquement un domaine GAP, mais également d'autres domaines qui permettent de favoriser des interconnexions entre les RhoGTPases et d'autres voies de signalisation. Ainsi, même si initialement les protéines RhoGAPs étaient uniquement décrites comme des « terminateurs de

signal » des RhoGTPases, elles agissent en réalité également comme des modules de reconnaissance pour d'autres protéines.

#### **IV. C. 1. b. Régulation des RhoGAPs**

Les protéines RhoGAPs sont hautement régulées dans la cellule. Cette régulation peut se faire par de multiples mécanismes, dont leur liaison aux lipides, leur interaction avec des protéines partenaires, leur phosphorylation ou leur dégradation protéique.

La protéine p190RhoGAP, une RhoGAP de RhoA, peut par exemple être phosphorylée par les tyrosine kinases Src, Abl (Abelson) ou Blk (B Lymphocyte Kinase). Cette phosphorylation permet à p190RhoGAP de s'associer à la protéine p120RasGAP et d'être ainsi activée (Hu and Settleman 1997). p190RhoGAP peut aussi être phosphorylée par la kinase GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase-3-beta), mais dans ce cas, cette phosphorylation entraîne une inhibition de l'activité GAP de p190RhoGAP (Jiang, Betson et al. 2008). Il a aussi été montré que p190RhoGAP peut être phosphorylée par la protéine kinase C (PKC). Cette phosphorylation se fait sur un motif de liaison de p190RhoGAP aux phospholipides, ce qui peut modifier sa localisation et donc son activité sur ses substrats (Levay, Settleman et al. 2009). La protéine MgcRacGAP (Male germ cell RacGAP) est un autre exemple de RhoGAP pouvant être régulée par phosphorylation. Cette protéine est connue pour avoir une activité GAP envers les GTPases Cdc42 et Rac1. Cependant, de manière surprenante, sa phosphorylation par la serine/thréonine kinase Aurora B lui procure une activité GAP envers RhoA (Minoshima, Kawashima et al. 2003).

Les RhoGAPs sont également régulées par leur interaction avec d'autres protéines. Ainsi, par exemple, ARAP3, une RhoGAP pour RhoA qui contient un domaine de liaison à Ras, est activée après son interaction avec Rap1, une GTPase de la famille Ras (Krugmann, Williams et al. 2004). Liao et ses collaborateurs ont aussi montré que la RhoGAP STARD12 interagit, elle, avec le domaine SH2 de la protéine Cten (C-terminal tensin Like). Cette interaction permet sa localisation au niveau des points d'adhésion focaux, où elle régule l'activité des RhoGTPases (Liao, Si et al. 2007).

Enfin, de façon classique, les RhoGAPs peuvent aussi être régulées par le système ubiquitine-protéasome, qui permet de contrôler leur niveau protéique dans la cellule. Ainsi, STARD12 est la cible de la E3 ubiquitine ligase RING CRL4-FBXW5 (Cullin 4A-RING ubiquitin Ligase) (Kim, Jackson et al. 2013). La dégradation de STARD12 par le protéasome suite à son ubiquitination par CRL4-FBXW5 entraîne une hausse de l'activité de RhoA et

une augmentation de la prolifération de cellules cancéreuses de poumon « non à petites cellules » (Kim, Jackson et al. 2013).

#### **IV. C. 2. Les protéines RhoGEFs**

En parallèle des protéines RhoGAPs qui inactivent les RhoGTPases, se trouvent les protéines RhoGEFs. Celles-ci activent les GTPases Rho en catalysant l'échange du GDP en GTP des RhoGTPases localisées à la membrane. Comme les RhoGAPs, les RhoGEFs sont nombreuses puisque le génome humain compte près de 80 GEFs. Les RhoGEFs sont divisées en 2 familles, la famille des RhoGEFs Dbl (Diffuse B-cell Lymphoma) et les DOCK (Dedicator Of Cytokinesis).

##### **IV. C. 2. a. La famille des RhoGEFs Dbl**

La famille des Dbl est composée de 69 membres, dont au moins 25 peuvent agir sur RhoA (Zheng 2001, Goicoechea, Awadia et al. 2014). La première protéine GEF a été découverte dans un lymphome à cellules B. Elle fut donc nommée Dbl pour Diffuse B-cell Lymphoma et donna son nom à la première famille de GEF (**Fig.35**) (Hart, Eva et al. 1991). Cette famille de RhoGEFs est caractérisée par la présence d'un domaine DH (Dbl Homology) d'environ 200 acides aminés et d'un domaine PH (Pleckstrin Homology) d'environ 100 acides aminés. Le domaine DH est le domaine catalytique. Il est responsable de la déstabilisation du complexe GDP-Rho et de la stabilisation d'une forme de Rho GTPase non liée aux nucléotides. Les GTPases Rho se lient alors plus favorablement au GTP, qui est en excès dans la cellule par rapport au GDP.

Le domaine PH peut se lier aux phosphoinositides et permettre ainsi la localisation des GEFs à la membrane. Le domaine PH se lie aussi au domaine DH, et semble ainsi réguler l'activité des GEFs. Ainsi, il a été montré que les fragments de protéines GEFs contenant les domaines DH et PH avaient une activité d'échange de nucléotides plus élevée *in vitro* et *in vivo* que les fragments ne contenant pas de domaine PH (Rossman and Campbell 2000).

En dehors de ces deux domaines DH et PH bien caractérisés, les protéines GEFs peuvent également posséder d'autres types de domaines très variés leur conférant des propriétés particulières.





**Figure 35 : Structure de la RhoGEF Dbl (d'après Zheng, 2001)**

*La première RhoGEF identifiée a été la protéine Dbl, qui a donné son nom à cette famille de RhoGEF. Elle est structurée comme toute cette famille avec un domaine DH (Dbl Homology) suivi d'un domaine PH (Pleckstrin Homology). De plus, elle possède un domaine d'autoinhibition N-terminale (Zheng 2001).*

#### **IV. C. 2. b. La famille des RhoGEFs DOCK**

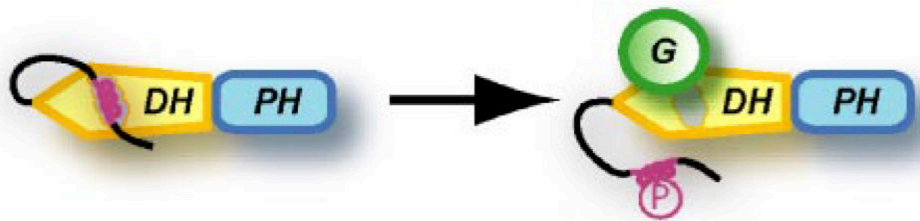
La famille des DOCK est plus récente et ne compte que 11 membres (Meller, Merlot et al. 2005). Les RhoGEFs de la famille DOCK sont différentes de la famille Dbl, du point de vue de leur structure mais également de leur mécanisme d'action. De plus, elles n'agissent que sur les GTPases Rac1 et Cdc42 mais n'ont aucun effet sur RhoA (Goicoechea, Awadia et al. 2014).

#### **IV. C. 2. c. Régulation des RhoGEFs**

Comme les RhoGAPs, la régulation des protéines RhoGEFs passe par des mécanismes très variés. Il semble que la délétion des domaines N-terminaux des GEFs de la famille Dbl, en amont du domaine DH, entraîne l'activation constitutive des GEFs, indiquant que ces domaines N-terminaux agissent comme des régulateurs négatifs des GEFs.

Ainsi, par exemple, il a été montré que la RhoGEF Tim (Transforming immortalized mammary), qui exerce une activité RhoGEF envers RhoA, est auto-inhibée par une interaction entre un court motif en hélice N-terminal au domaine DH, empêchant la liaison entre la RhoGEF et ses RhoGTPases cibles. Cette auto-inhibition est levée par la phosphorylation de ce motif en hélice, notamment par la kinase Src (Yohe, Rossman et al. 2007, Yohe, Rossman et al. 2008). Ce mécanisme d'auto-inhibition semble exister dans plusieurs autres RhoGEFs, notamment la famille Vav (**Fig.36**).

De plus, un autre mécanisme d'inhibition existe pour la RhoGEF Tim. En effet, cette RhoGEF possède un domaine SH3 C-terminal qui inhibe également la RhoGEF en se fixant aussi sur son domaine DH. Ce mécanisme d'auto-inhibition semble exister pour plusieurs RhoGEFs qui, comme Tim, ont un motif SH3 N-terminal (Yohe, Rossman et al. 2008).



**Figure 36 : Mécanisme d'activation de la RhoGEF Tim (d'après Yohe et al, 2007)**

*La RhoGEf Tim est inhibée par une interaction entre son domaine DH et un motif en hélice N-terminal. La phosphorylation de ce motif en hélice lève cette inhibition (Yohe, Rossman et al. 2007).*

### IV. C. 3. Les protéines RhoGDIs

#### IV. C. 3. a. Généralités

Contrairement aux protéines RhoGAPs et RhoGEFs qui sont très nombreuses dans la cellule, seulement trois protéines RhoGDIs ont été identifiées chez l'Homme : RhoGDI1, RhoGDI2 et RhoGDI3. RhoGDI1 est exprimée de manière ubiquitaire, et cible la plupart des GTPases Rho dont RhoA (Fukumoto, Kaibuchi et al. 1990, Leonard, Hart et al. 1992). RhoGDI2 est exprimée principalement dans les cellules hématopoïétiques et semble spécifique des GTPases de la sous-famille Rac1. RhoGDI3 est, elle, peu abondante, et exprimée de manière moins ubiquitaire que RhoGDI1, elle est retrouvée principalement dans le cerveau mais aussi dans les poumons et les reins. RhoGDI3 interagit avec plusieurs RhoGTPases *in vitro* mais elle semble être spécifique de RhoG dans la cellule (Olofsson 1999, Brunet, Morin et al. 2002, Dransart, Olofsson et al. 2005).

#### IV. C. 3. b. Fonctionnement des RhoGDIs

Les RhoGDIs sont des inhibiteurs de la dissociation du GDP des GTPases Rho. La liaison des RhoGDIs aux GTPases Rho masque leur extrémité C-terminale prénylée, ce qui induit leur dissociation de la membrane et entraîne ainsi la formation d'une réserve de RhoGTPases inactives dans le cytoplasme. Pour être activées par les GEFs, les GTPases Rho doivent tout d'abord se dissocier des GDIs. En effet, les sites de fixation des GDIs et GEFs sur les régions « switch I » et « switch II » pour RhoA se chevauchent, ce qui empêche les RhoGTPases d'interagir simultanément avec ces deux types de protéines (Dovas and Couchman 2005). Il a

également été montré que la phosphorylation de la sérine 188 de la GTPase RhoA favorise son association avec RhoGDI1 (**cf. Chapitre 5/ IV. B.**). Celle-ci peut ainsi s'associer de manière inhabituelle à la GTPase RhoA, encore liée au GTP, et permet ainsi d'avoir une réserve de RhoA activée disponible, même en absence de RhoGEF (Rolli-Derkinderen, Sauzeau et al. 2005).

Les mécanismes qui permettent la libération des RhoGTPases des RhoGDIs et leur activation par les RhoGEFs restent en partie non élucidés. Néanmoins, il a été montré que les protéines de la famille ERM (Ezrin, Radixin et Moesin), qui interagissent avec les lipides de la membrane et l'actine du cytosquelette, peuvent aussi s'associer aux RhoGDIs, ce qui libère les RhoGTPases des RhoGDIs et les active (Ivetic and Ridley 2004). L'interaction des RhoGDIs avec d'autres partenaires, dont les phospholipides ou la tyrosine kinase ERK, permet également de dissocier le complexe Rho/RhoGDI et d'activer les GTPases Rho (Garcia-Mata, Boulter et al. 2011). En revanche, un tel rôle pour les RhoGEFs ne semble pas évident.

La phosphorylation constitue un autre mode de régulation de l'activité des GDIs. En effet, il a été montré que la phosphorylation de RhoGDI1 par la PKC (Protéine Kinase C) sur son résidu sérine96 entraîne sa dissociation de RhoA et de Rac1 (Sabbatini and Williams 2013). Cependant, la phosphorylation de RhoGDI1 par la kinase PAK1 (p21-Activated Kinase 1) entraîne sa désolidarisation de la GTPase Rac1 mais pas de RhoA, indiquant que la nature de la phosphorylation de RhoGDI1 conditionne la spécificité de son activité envers les RhoGTPases (DerMardirossian, Schnelzer et al. 2004).

Ces trois familles de protéines constituent des régulateurs majeurs des RhoGTPases dans la cellule. C'est l'action de ces trois familles de protéines qui va en effet permettre de contrôler le taux de GTPases activées et inactives dans la cellule en agissant directement sur leur activité mais également en régulant leur dégradation, leur localisation cellulaire ou leur interaction avec d'autres protéines dans la cellule.

## **V. RhoA et cancer**

### **V. A. Mutations et expression génique de RhoA**

Par ses différentes fonctions sur le cytosquelette d'actine, la prolifération ou l'expression génique, RhoA apparaît comme une protéine dont la dérégulation pourrait jouer un rôle

important dans les processus de cancérogenèse. A la différence des GTPases Ras, peu de mutations de RhoA, et des RhoGTPases en général, ont été trouvées dans les cancers. En revanche, l'expression de RhoA est souvent altérée, la plupart du temps augmentée, dans de nombreux types de cancer (**Fig.37**).

Fritz et ses collaborateurs ont par exemple montré que l'expression du gène *RhoA* et du taux protéique de RhoA sont augmentés dans les tumeurs mammaires, et que le niveau protéique de RhoA est corrélé positivement avec le grade des tumeurs. Il est intéressant de noter que le niveau d'ARNm de RhoA reste lui inchangé entre les tumeurs des différents grades, suggérant que l'élévation du niveau protéique de RhoA dans les tumeurs mammaires de grades élevés est due à une stabilisation protéique (Fritz, Just et al. 1999, Fritz, Brachetti et al. 2002).

RhoA est également surexprimé dans une variété de tumeurs cancéreuses (**Fig.37**) (Karlsson, Pedersen et al. 2009). De plus, la surexpression de RhoA est très souvent associée à des tumeurs de grades élevés, suggérant que RhoA favoriserait les stades tardifs de la cancérogenèse, et particulièrement le développement de métastases.

<b>Cancers dans lesquels RhoA est surexprimé</b>	<b>Référence</b>
<b>Cancer du sein</b>	(Fritz, Brachetti et al. 2002)
<b>Carcinome hépatocellulaire</b>	(Fukui, Tamura et al. 2006) (Li, Ji et al. 2006)
<b>Cancer de la vessie</b>	(Kamai, Tsujii et al. 2003)
<b>Cancer de l'œsophage</b>	(Faried, Faried et al. 2007)
<b>Cancer de la tête et du cou</b>	(Abraham, Kuriakose et al. 2001)
<b>Cancer des ovaires</b>	(Horiuchi, Imai et al. 2003)
<b>Cancer gastrique</b>	(Pan, Bi et al. 2004)
<b>Cancer des testicules</b>	(Kamai, Yamanishi et al. 2004)
<b>Cancer du côlon</b>	(Fritz, Just et al. 1999)
<b>Cancer du poumon</b>	(Fritz, Just et al. 1999)

**Figure 37: Surexpression de RhoA dans les cancers (d'après karlsson et al, 2009)**

## **V. B. Rôle de RhoA dans les processus de cancérogenèse**

L'implication de RhoA dans des fonctions cellulaires telles que le remodelage du cytosquelette d'actine laisse suggérer que la dérégulation de l'expression de RhoA observée dans les cancers va permettre à la cellule normale de subir des changements morphologiques importants et d'acquérir des propriétés de cellules cancéreuses.

### **V. B. 1. Régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse**

Plusieurs études ont indiqué que RhoA était impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) induite par le TGF- $\beta$  (**Chapitre 1/ II. B. 3.**). La TEM permet aux cellules épithéliales tumorales d'acquérir des caractéristiques fibroblastiques et de quitter la tumeur primaire. Le TGF- $\beta$  induit la TEM en induisant l'activation transitoire de RhoA (Bhowmick, Ghiassi et al. 2001). Ozdamar et ses collaborateurs ont montré que RhoA était dégradé par la E3 ubiquitine ligase Smurf1 après traitement au TGF- $\beta$ , ce qui semble nécessaire pour la dissolution des jonctions cellules-cellules et à la TEM. En effet, la GTPase RhoA, mutée sur les résidus lysine K6 et K7, et par conséquent non dégradée par Smurf1, inhibe la TEM induite par le TGF- $\beta$  (Ozdamar, Bose et al. 2005). Plus récemment, il a été montré que le TGF- $\beta$  induisait la transcription de la protéine SND1 (Staphylococcal nuclease domain-containing 1), une protéine du complexe RISC (RNA-induced silencing complex) qui régule les ARNm *via* des micro-RNA et considérée comme un oncogène (Tsuchiya and Nakagama 2010). SND1 favorise, à son tour, la transcription de Smurf1. Smurf1 entraîne alors la dégradation de RhoA et favorise la TEM induite par le TGF- $\beta$  (Bhowmick, Ghiassi et al. 2001, Yu, Liu et al. 2015).

Après la TEM, les cellules cancéreuses peuvent subir à l'inverse une TME, une transition mésenchymo-épithéliale, pour former une tumeur secondaire ou des métastases mais les cellules cancéreuses peuvent aussi subir une TMA, transition mésenchymo-amœboïde, qui va entraîner un « arrondissement » des cellules leur permettant notamment de migrer et de former des métastases.

### **V. B. 2. Régulation de la migration**

Les cellules cancéreuses peuvent migrer soit individuellement soit collectivement. De manière individuelle, deux types de migration sont distinguées, mésenchymale ou amœboïde

(Vega and Ridley 2008). La migration mésenchymale est réalisée par des cellules très protrusives qui produisent des enzymes qui dégradent la matrice extra cellulaire (MEC), telles que des métallo-protéases (MMP). Cette migration est similaire à la migration collective où les cellules s'étirent puis s'appuient grâce à la formation de pseudopodes pour ensuite se contracter et migrer. Elles « suivent » une cellule invasive, protrusive, qui dégrade la MEC grâce à des MMPs pour permettre le passage de la cellule mésenchymateuse rigide par son cytosquelette. Au contraire, la migration amœboïde se produit indépendamment de la dégradation de la MEC, leur permettant de passer à travers la MEC sans la dégrader. Les cellules réalisant cette migration ont un morphotype plus arrondi. Bien qu'ayant un rôle dans les deux types de migration, RhoA est avant tout un acteur majeur de la migration amœboïde.

Il semble clair aujourd'hui que la surexpression de RhoA dans les cellules conduit ces cellules à adopter un phénotype « arrondi ». Il a en effet été montré que la surexpression de RhoA dans différentes cellules épithéliales entraîne la formation d'un cortex d'actine autour des cellules qui permet à celles-ci de s'arrondir. Des extensions de cortex appelées « blebs » (Sahai and Marshall 2003) apparaissent lors de l'activation de RhoA. Ces « blebs » sont des expansions de la membrane plasmique de forme arrondie, qui sont initiés par une séparation de la membrane plasmique du cortex d'actine. En accord avec ces observations, différentes études ont montré que la diminution de l'expression de RhoA dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses mammaires et prostatiques entraîne la formation de longues protrusions cellulaires, qui favorisent un phénotype allongé de ces cellules, alors que la surexpression de RhoA induit leur migration (Caceres, Guerrero et al. 2005, Vega, Fruhwirth et al. 2011, Sadok, McCarthy et al. 2015). Cette morphologie arrondie et l'apparition de « blebs » à la membrane suite à l'augmentation de l'activité de RhoA va permettre aux cellules de migrer selon un mode « amœboïde », et favoriser le développement tumoral (Vega, Fruhwirth et al. 2011).

### **V. B. 3. Rôle de RhoA dans la formation des métastases**

Des études se sont également intéressées rôle de RhoA dans la tumorigénèse mammaire et particulièrement dans la formation de métastases. En effet, l'expression d'un dominant négatif de RhoA réduit le développement de métastases au poumon à partir de tumeurs mammaires chez le rat (Bouzahzah, Albanese et al. 2001). De même, Pillé et ses collaborateurs ont montré que l'injection de siRNA dirigés contre RhoA, dans des tumeurs formées par des cellules MDA.MB.231 injectées de manière sous-cutanée dans des souris nude, réduisait la

croissance et l'angiogenèse de ces tumeurs (Pille, Denoyelle et al. 2005).

Une autre étude intéressante est celle de Weinberg et ses collaborateurs. Ils ont en effet montré qu'un micro-RNA, le mir-31, avait une expression inversement corrélée au potentiel métastatique de tumeurs mammaires de patients. Il semble que la surexpression de trois protéines, l'Integrine  $\alpha 5$ , la Radixin, et RhoA suppriment l'effet anti-métastatique de mir-31. Les auteurs ont alors transfectées des cellules MDA.MB.231 avec des shRNA contre ces trois protéines et les ont injectées dans des souris nude. Ces souris développent moins de métastases que les souris injectées avec les cellules contrôles. Ce résultat indique que RhoA joue un rôle dans la formation de métastases issues de tumeurs mammaires (Valastyan, Chang et al. 2010)

De plus, l'utilisation d'une drogue qui inhibe la HMG-CoA reductase, la Cerivastatine, qui inhibe RhoA en empêchant sa localisation membranaire, réduit les capacités à sécréter la métallo-protéase MMP9 et les capacités invasives des cellules MDA.MB.231, en inhibant RhoA, ce qui est moins le cas pour des cellules faiblement métastatiques comme les MCF7, suggérant que RhoA a principalement un rôle sur les stades tardifs de la cancérogenèse (Bourguignon 2001, Denoyelle, Vasse et al. 2001).

RhoA est une GTPase cruciale dans la cellule, particulièrement *via* son activité sur le cytosquelette d'actine. Il semble que la régulation spatio-temporelle de l'activité de RhoA a des conséquences importantes sur ses fonctions biologiques et également sur la cancérogenèse, RhoA ayant été montré comme étant impliquée dans plusieurs processus participant aux différents stades de la cancérogenèse.

## ETAT DE LA QUESTION

---

Il est maintenant admis que le TGF- $\beta$  est un acteur majeur de la cancérogenèse. De par son effet biphasique, il est à la fois suppresseur de tumeur dans les premiers stades de la cancérogenèse grâce notamment à son rôle anti-prolifératif et pro-apoptotique, mais il est également protumoral dans les stades tardifs de la cancérogenèse par ses effets invasifs et métastatiques. Des altérations (mutation, délétion, sous-expression ou surexpression) de gènes codant pour plusieurs composants de la voie du TGF- $\beta$  ont été identifiées, comme par exemple T $\beta$ RII ou Smad4, cependant celles-ci n'expliquent pas toutes les dérégulations de la signalisation TGF- $\beta$  observées dans les cancers (Drabsch and ten Dijke 2012). Mon laboratoire a donc cherché à identifier de nouveaux éléments régulant cette signalisation et pouvant être altérés lors des processus cancéreux. Pour cela, un crible double hybride a été réalisé chez la levure avec comme appât Smad7, une protéine inhibitrice de la signalisation TGF- $\beta$ . Plusieurs protéines d'intérêt ont été identifiées, dont la E3 ubiquitine ligase WWP1/Tiul1. Mon laboratoire a montré que WWP1 réprime la signalisation TGF- $\beta$  en induisant la polyubiquitination et la dégradation de T $\beta$ RI activé *via* son association à Smad7 (Seo, Lallemand et al. 2004). WWP1 est actuellement décrit dans la littérature comme ayant une activité oncogénique. Le gène *WWP1* est en effet amplifié dans plus de 30% des tumeurs mammaires et prostatiques (Chen, Sun et al. 2007, Chen, Zhou et al. 2007). En revanche, très peu de mutations de *WWP1* sont retrouvées dans les cancers. De plus, la surexpression de WWP1 dans des cellules cancéreuses mammaires et prostatiques induit leur prolifération alors que la diminution de son expression induit leur apoptose et inhibe l'effet anti-prolifératif du TGF- $\beta$  (**cf. Chapitre 3/ V. C. 2.**) (Chen, Sun et al. 2007, Chen, Zhou et al. 2007). Une étude a cependant suggéré que WWP1 avait également le potentiel de réduire le développement de métastases osseuses issues de cellules cancéreuses mammaires dans un modèle murin (**cf. Chapitre 3/ V. C. 3.**) (Subik, Shu et al. 2012), suggérant que le rôle de WWP1 durant la cancérogenèse est peut-être plus complexe qu'il n'y paraît.

Un des objectifs de recherche du laboratoire est donc de caractériser les différents mécanismes moléculaires mis en jeu par WWP1 dans la cellule ainsi que sa régulation, afin de pouvoir par la suite mieux décrypter son rôle dans la progression tumorale liée au TGF- $\beta$ . Dans ce contexte, mon projet de thèse a consisté à essayer d'identifier des mécanismes



moléculaires de régulation et d'action de WWP1 dont la dérégulation pourrait être impliquée dans la cancérogenèse. Pour cela, les objectifs suivants ont été poursuivis durant ma thèse :

## **Projet 1 : Caractérisation d'un mécanisme de régulation de l'activité catalytique de WWP1**

Les E3 ubiquitine ligases jouent un rôle crucial lors des réactions d'ubiquitination en déterminant notamment la spécificité des substrats ubiquitinés. Les E3 ubiquitine ligases ont longtemps été considérées comme étant constitutivement activées dans la cellule, mais il apparaît de plus en plus que leur activité catalytique est en fait finement régulée.

Des études ont été menées pour élucider le mécanisme conduisant à la régulation de l'activité catalytique de certaines E3 ubiquitine ligases à domaine HECT. Cette famille de E3 ligases, dont WWP1 fait partie, possède une organisation structurale avec trois types de domaines fonctionnels, un domaine C2 de liaison aux phospholipides, 4 domaines WW qui interagissent avec des motifs PPxY de protéines partenaires et enfin un domaine catalytique HECT (**cf. Chapitre 3/ I.**). Il a été montré que plusieurs E3 ubiquitine ligases de cette famille établissent des interactions intramoléculaires entre leur domaine HECT et leurs domaines C2 ou WW. Ces interactions permettent de réguler leur activité catalytique.

Il a par exemple été montré que l'activité catalytique de la E3 ligase Smurf2 est inhibée par une interaction intramoléculaire entre ses domaines HECT et C2 (Wiesner, Ogunjimi et al. 2007). La délétion du domaine C2 de Smurf2 permet de lever cette auto-inhibition, ce qui conduit à une augmentation de son activité catalytique. A la différence de Smurf2, il n'y a pas d'interaction intramoléculaire entre les domaines HECT et C2 de Smurf1, ce qui expliquerait que Smurf1 ait une activité ligase plus élevée que Smurf2 dans la cellule (Lu, Li et al. 2011). Cependant, d'après Wan et ses collaborateurs, Smurf1 est présent dans la cellule sous forme de dimères catalytiquement inactifs, le domaine C2 d'un monomère s'associant avec le domaine HECT de l'autre monomère. L'activité catalytique de Smurf1 est alors induite lorsque la protéine Cdh1, un activateur du complexe APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome), se lie sur le domaine C2 de Smurf1 et entraîne la rupture du dimère de Smurf1 (Wan, Zou et al. 2011). L'activité catalytique de Smurf1 peut également être stimulée par son association avec la protéine CKIP-1 (Casein Kinase-2 Interacting Protein-1) au niveau de ces domaines WW (Lu, Yin et al. 2008, Nie, Liu et al. 2014). De plus,

une étude récente vient de montrer que la neddylation de Smurf1 favorisait aussi son activité catalytique (Xie, Zhang et al. 2014).

Une interaction intramoléculaire entre les domaines WW et HECT a également été décrite pour les E3 ubiquitine ligases à domaines HECT, Nedd4-2 et AIP4/Itch. En effet, leurs domaines WW se lient sur un motif PPxY de leur domaine HECT, entraînant une inhibition de leur activité catalytique (Gallagher, Gao et al. 2006, Bruce, Kanelis et al. 2008, Wang, Peng et al. 2010). Cette inhibition est levée par interaction des ces E3 ligases avec les protéines NDFIPs (Nedd4-Family-Interacting Proteins) ou lorsqu'elles sont phosphorylées par la serine/ thréonine kinase JNK (Gao, Labuda et al. 2004, Shearwin-Whyatt, Dalton et al. 2006, Mund and Pelham 2009). AIP4 peut aussi être phosphorylée par la kinase Fyn (Yang, Zhou et al. 2006). Cependant, contrairement à la phosphorylation par la kinase JNK, la phosphorylation par Fyn n'induit pas l'activité catalytique de AIP4 mais inhibe l'activité de AIP4 envers ses substrats en réduisant leur affinité de liaison (Yang, Zhou et al. 2006).

Malgré son implication dans la cancérogenèse, les mécanismes conduisant à la régulation de l'activité catalytique de WWP1 n'avaient pas encore été caractérisés. Lors de la première partie de ma thèse, j'ai donc essayé de mettre en évidence les mécanismes par lesquels l'activité ligase de WWP1 est contrôlée dans la cellule. Je me suis également intéressé à un mutant de WWP1, détecté dans une tumeur de la prostate, afin d'examiner si, et le cas échéant comment, cette mutation de WWP1 pouvait déréguler son activité catalytique.

## **Projet 2 : Caractérisation d'un mécanisme d'action de WWP1 en association avec son nouveau partenaire STARD13**

Afin d'identifier de nouveaux mécanismes mis en jeu par WWP1 dans la cellule, et dont la dérégulation pourrait être impliquée dans la cancérogenèse, mon laboratoire a cherché de nouveaux partenaires de WWP1. Un crible double-hybride, avec comme appât WWP1, a donc été réalisé dans la levure en association avec la société Hybrigenics (Paris). Parmi les nouveaux partenaires potentiels de WWP1 identifiés, nous nous sommes intéressé à la protéine STARD13.

STARD13 est une protéine possédant un domaine N-terminal SAM (Sterile Alpha Motif) d'interaction protéine-protéine, un domaine C-terminal START (STAR-related lipid transfer) de liaison lipidique et un domaine GAP (GTPase-Activating Protein) qui lui permet

d'inactiver les RhoGTPases en stimulant leur activité GTPasique intrinsèque (**cf. Chapitre 5/ IV. C. 1.**). STARD13 exerce son activité de RhoGAP principalement envers la GTPase RhoA, un régulateur majeur du cytosquelette d'actine, qui est également impliquée dans les processus de Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) induits par le TGF- $\beta$ . En accord avec ces observations, STARD13 réduit la migration de cellules d'hépatocarcinomes HepG2 en inhibant la formation de fibres de stress d'actine (Leung, Ching et al. 2005). De plus, STARD13 est actuellement considérée comme un suppresseur de tumeur, notamment dans les cancers du sein où son expression est souvent diminuée (Ullmannova and Popescu 2006, Hanna, Khalil et al. 2014). STARD13 nous a donc paru comme un nouveau partenaire potentiel de WWP1 très intéressant à étudier.

Le deuxième projet de ma thèse a donc consisté à déterminer les conséquences moléculaires et fonctionnelles de l'association de WWP1 avec STARD13. Ceci devrait ainsi permettre de révéler un nouveau mécanisme mis en jeu par WWP1 dans la cellule, qui, s'il est dérégulé, pourrait favoriser la cancérogenèse.

# RESULTATS

---

## Projet 1 : Caractérisation d'un mécanisme de régulation de l'activité catalytique de WWP1

---

### Résumé de l'Article 1

« Functionnal characterization of a WWP1/tiul1 tumor-derived mutant reveals a paradigm of its constitutive activation in human cancer »

Bien que les E3 ubiquitine ligases aient été principalement décrites comme constitutivement activées, il semble maintenant qu'elles sont aussi sujettes à des régulations (**cf. Etat de la question**). Afin de mieux caractériser WWP1, l'un des objectifs de ma thèse était donc d'étudier la régulation de son activité catalytique.

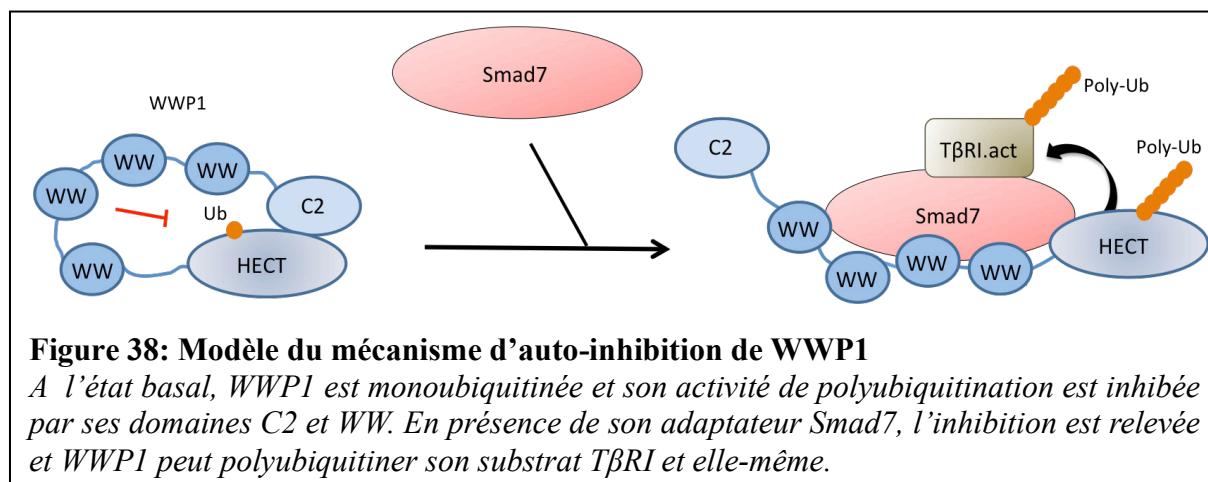
Nous avons observé qu'à l'état basal WWP1 est monoubiquitinée avec une activité d'auto-polyubiquitination faible. Ainsi, à l'état basal, WWP1 est une protéine stable. Par contre, lorsqu'elle est déletée de ses domaines d'ancrage à la membrane C2 et d'interaction protéine-protéine WW, et qu'elle n'est donc constituée que de son domaine catalytique HECT, elle est fortement polyubiquitinée et dégradée par le protéasome et les lysosomes. La mutation de la cystéine active du domaine HECT en alanine (mutation C890A) engendre une protéine WWP1 catalytiquement inactive puisque WWP1 devient alors incapable de conjuguer l'ubiquitine. Ce mutant HECT.C890A est beaucoup moins ubiquitiné que la forme sauvage de HECT, confirmant que la polyubiquitination du domaine HECT de WWP1 est catalysée principalement par WWP1 elle-même et non par d'autres E3 ubiquitine ligases. Ces résultats suggèrent que les domaines C2 et/ou WW de WWP1 jouent un rôle crucial dans la stabilité de la protéine et soulèvent la question du mécanisme moléculaire mis en jeu par ces domaines pour réguler l'activité catalytique du domaine HECT.

Les données de la littérature décrivent une interaction intramoléculaire entre les domaines HECT et C2 de la E3 ubiquitine ligase Smurf2, responsable de son auto-inhibition

(Wiesner, Ogunjimi et al. 2007). Comme WWP1 et Smurf2 sont deux E3 ubiquitine ligases à domaine C2-WW-HECT assez similaires, nous avons émis l'hypothèse que le domaine C2 de WWP1 pouvait aussi interagir avec son domaine HECT. Nous avons observé une interaction entre le domaine d'ancrage à la membrane C2 et le domaine catalytique HECT de WWP1. Cette interaction intramoléculaire semble être fonctionnelle puisque l'expression de doses croissantes du domaine C2 favorise l'apparition de formes monoubiquitinées de WWP1, au détriment de formes polyubiquitinées, entraînant une stabilisation du domaine HECT. Le domaine C2 de WWP1 semble ainsi exercer un rôle protecteur sur WWP1 en inhibant son activité catalytique. De la même manière, nous avons également cherché à savoir si les domaines WW de WWP1 pouvaient stabiliser le domaine HECT. Même si nous n'avons jamais été en mesure d'observer une interaction entre les domaines WW et HECT de WWP1, il semble que les domaines WW de WWP1 soient également des régulateurs de son activité catalytique. En effet, la délétion des quatre domaines WW dans WWP1 entraîne fortement la polyubiquitination de WWP1 tandis que la fusion de domaines WW au domaine HECT réduit sa polyubiquitination. L'ensemble de ces résultats indique donc que les domaines C2 et surtout WW de WWP1 jouent un rôle crucial dans la régulation de la stabilité de WWP1, en inhibant son activité catalytique de polyubiquitination. Dans ces conditions, WWP1 et ses substrats sont ainsi protégés de la dégradation dans la cellule.

Puisque Smad7, un adaptateur de WWP1, est nécessaire à WWP1 pour induire la polyubiquitination du récepteur de type I activé au TGF- $\beta$  (T $\beta$ RI), nous avons ensuite cherché à savoir si Smad7 jouait un rôle dans la régulation de l'activité catalytique de WWP1. Nous avons observé que l'expression de doses croissantes de Smad7 entraîne une déstabilisation de WWP1 alors que la diminution de son expression par transfection de siRNA dirigés contre Smad7 stabilise le niveau protéique endogène de WWP1 dans plusieurs lignées cellulaires. Smad7 pourrait donc jouer un rôle dans la régulation de son activité catalytique. La déstabilisation de WWP1 par Smad7 semble résulter d'une action sur l'activité catalytique de WWP1, car Smad7 n'a aucun effet sur le niveau protéique du mutant catalytiquement inactif WWP1.C890A. Ceci est confirmé par les expériences dans lesquelles des doses croissantes de Smad7 stimulent la polyubiquitination de WWP1. La recherche du mécanisme moléculaire par lequel Smad7 affecte l'activité catalytique de WWP1 a permis de mettre en évidence qu'en présence de la protéine adaptatrice Smad7, l'inhibition exercée par les domaines C2 ou WW sur le domaine HECT est levée. Ceci conduit à une augmentation de l'activité de

polyubiquitination de WWP1 envers elle-même et ses substrats et permet une régulation stricte de son activité catalytique (**Fig.38**).



Nous nous sommes ensuite demandé si ce mécanisme de régulation de l'activité de WWP1 pouvait être altéré dans les cancers. Pour cela, nous avons généré différents vecteurs d'expression de WWP1 en y insérant, par mutagenèse dirigée, des mutations de WWP1 détectées dans des cancers prostatiques. Nous avons observé qu'une forme mutée de WWP1 (WWP1.E798V), contenant une substitution du résidu glutamate en position 798 en valine dans le domaine HECT (Chen, Sun et al. 2007), détectée dans un cancer de la prostate, est incapable de s'autoréguler selon ce modèle. La présence de cette mutation dans WWP1 entraîne une activation constitutive de la E3 ligase WWP1. En effet, à l'état basal, la protéine WWP1.E798V est polyubiquitinée, contrairement à la forme sauvage de la protéine WWP1 qui est monoubiquitinée. Une hypothèse permettant d'expliquer ce résultat serait que le mutant WWP1.E798V soit « misfoldé » et donc ciblé pour être polyubiquitiné et dégradé. Nous avons donc introduit la mutation C890A dans le mutant WWP1.E798A afin de créer un mutant catalytiquement inactif (WWP1.E798A/C890A). Nous avons observé que ce double mutant n'était plus polyubiquitiné, indiquant que le mutant WWP1.E798V possède bien une activité d'auto-polyubiquitination propre. En ce qui concerne le mécanisme à l'origine de l'augmentation de la polyubiquitination chez le mutant WWP1.E798V, nous avons montré que les effets répresseurs des domaines C2 et WW sur le domaine catalytique HECT étaient réduits pour WWP1.E798V par rapport à WWP1 sauvage.

De plus, nous avons observé que l'augmentation de l'activité catalytique de WWP1.E798V envers elle-même était également associée à une hausse de son activité E3 ubiquitine ligase envers son substrat le récepteur activé T $\beta$ RI. La forme mutée WWP1.E798V est en effet plus efficace que la forme sauvage de WWP1 pour induire la polyubiquitination et la dégradation du récepteur activé T $\beta$ RI et donc par conséquent l'inhibition de la réponse transcriptionnelle au TGF- $\beta$ . Cette observation a été confirmée dans la lignée cellulaire prostatique RWPE où l'expression de la forme mutée WWP1.E798V, même diminuée par rapport à la forme sauvage de WWP1, inhibe la réponse anti-proliférative du TGF- $\beta$  de façon plus efficace que la forme sauvage WWP1. Ces résultats révèlent ainsi pour la première fois un mécanisme moléculaire régulant l'activité catalytique de WWP1 susceptible d'augmenter le potentiel oncogénique de WWP1 durant la cancérogenèse liée au TGF- $\beta$ .

**Article 1 : Fonctionnal characterization of a WWP1/Tiul1 tumor derived mutant reveals a paradigm of its constitutive activation in human cancer.**

Courivaud T, Ferrand N, Elkhattouti A, Kumar S, Levy L, Ferrigno O, Atfi A and Prunier C.

*Publié dans The Journal of Biological Chemistry, Juillet 2015.*



## Functional characterization of a WWP1/Tiul1 tumor-derived mutant reveals a paradigm of its constitutive activation in human cancer

Thomas Courivaud<sup>1,2</sup>, Nathalie Ferrand<sup>1,2</sup>, Abdelouahid Elkhattouti<sup>3</sup>, Santosh Kumar<sup>3</sup>  
Laurence Levy<sup>1,2</sup>, Olivier Ferrigno<sup>1,2</sup>, Azeddine Atfi<sup>1,2,3</sup> and Céline Prunier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>From UPMC, Université Paris 06, Paris, France

<sup>2</sup>INSERM UMR S 938, Laboratory of Cell Signaling and Carcinogenesis, Paris, France

<sup>3</sup>Cancer Institute and Department of Biochemistry, University of Mississippi Medical Center, Mississippi, USA

\*Running title: *Mutational activation of WWP1*

To whom correspondence should be addressed: Céline Prunier, Laboratory of Cell Signaling and Carcinogenesis, Hôpital Saint-Antoine, 34 rue Crozatier, 75012 Paris, France, Tel.: (33,1) 49 28 66 90; E-mail: [celine.prunier@inserm.fr](mailto:celine.prunier@inserm.fr)

**Keywords:** E3 ubiquitin ligase, WWP1/Tiul1, protein degradation, enzyme mutation, TGF- $\beta$ , cancer biology, signaling

**Background:** WWP1/Tiul1 plays an instrumental role in cancer pathogenesis by restricting TGF $\beta$  cytosolic signaling.

**Results:** We identified a novel mechanism of inhibition of WWP1 that is disrupted by a tumor mutation found in prostate cancer.

**Conclusion:** Mutational activation of WWP1 contributes to the loss of TGF $\beta$  signaling in cancer.

**Significance:** Our data unveil a paradigm behind WWP1 hyperactivation in cancer.

### ABSTRACT

Although E3 ubiquitin ligases are deemed to play key roles in normal cell function and homeostasis, whether their alterations contribute to cancer pathogenesis remains unclear. In this study we sought to investigate potential mechanisms that govern WWP1/Tiul1 (WWP1) ubiquitin ligase activity, focusing on its ability to trigger degradation of TGF $\beta$  type I receptor (T $\beta$ RI) in conjunction with Smad7.

**Our data reveal that the WWP1 protein is very stable at steady states because its auto-polyubiquitination activity is silenced due to an intra-interaction between the C2 and/or WW and Hect domains that favors WWP1 monoubiquitination at the expense of its polyubiquitination or polyubiquitination of T $\beta$ RI. Upon binding of WWP1 to Smad7, this functional interplay is disabled, switching its monoubiquitination activity towards a polyubiquitination activity, thereby driving its own degradation and that of T $\beta$ RI as well. Intriguingly, a WWP1 point mutation found in human prostate cancer disrupts this regulatory mechanism by relieving the inhibitory effects of C2 and WW on Hect and thereby causing WWP1 hyperactivation. That cancer-driven alteration of WWP1 culminates in excessive T $\beta$ RI degradation and attenuated TGF $\beta$  cytostatic signaling, a consequence that could conceivably confer tumorigenic properties to WWP1.**

## INTRODUCTION

The posttranslational modification known as ubiquitination involves the covalent attachment of a polypeptide ubiquitin to a protein substrate. In addition to its well-established function in protein degradation, ubiquitination regulates a plethora of other biological processes, including endocytosis, DNA damage response, translation control, or subcellular localization, depending on the type of the ubiquitin chain linkage that is conjugated. Proteins can be monoubiquitinated or polyubiquitinated. Ubiquitin possesses a total of 7 inner lysine residues (Lys 6, 11, 27, 29, 33, 48, 63), all of them behave as a potential attachment site for another ubiquitin moiety, resulting in different subsets of ubiquitin chains (1). Polyubiquitin chains might also be heterogeneous with two or more ubiquitin moieties linked to distinct internal lysine residues (2). Irrespective of the type of ubiquitin chains, the process of ubiquitination is carried out by the sequential action of three types of enzymes: an E1 ubiquitin-activating enzyme, an E2 ubiquitin-conjugating enzyme, and an E3 ubiquitin ligase. The E1 activates ubiquitin by attaching to it in an ATP-dependent manner; activated ubiquitin is then

transferred to an E2, which in concert with E3, specifically attaches ubiquitin to its targets through the  $\epsilon$ -amino group of a lysine residue. E3 ubiquitin ligases are therefore responsible for the specificity of the ubiquitination process. There are two major classes of E3 ubiquitin ligases, defined by the presence of either a Hect (homologous to E6-AP carboxyl-terminal) domain or a RING (Really Interesting New Gene) finger motif. RING E3s act as scaffold proteins by bringing the E2 enzyme and the substrate into close proximity to each other, whereas Hect E3s form covalent thioester intermediates with ubiquitin before transferring it to target proteins (1).

WWP1/Tiul1 (hereafter referred to as WWP1) is an E3 ubiquitin ligase that belongs to the Hect family, which also includes Nedd4, Itch, Smurf1, and Smurf2, among others. This family is characterized by a N-terminal phospholipid and calcium-binding C2 domain that mediates membrane localization, two to four WW domains that bind to PPXY (PY) motif in substrates, and a C-terminal catalytic Hect domain that possesses an intrinsic ubiquitin transfer activity (3-5). The resolution of the crystal structure of the WWP1 Hect domain revealed a two-lobed structure (6). The rotation of the C-lobe around a polypeptide hinge connecting the N and C lobes is essential for WWP1 ligase activity. This structural architecture is found throughout the Nedd4 family, which appeared to add ubiquitin one by one from the catalytic cysteine to the lysine at the end of a growing chain, a process termed sequential addition mechanism.

Owing to its alterations in numerous malignancies, several published data have postulated that WWP1 functions as an oncogenic protein (3,5). For instance, the *WWP1* gene has been found to be amplified in more than 30% of breast and prostate cancer tumors (7-10) and several functional studies have shown that WWP1 knockdown was sufficient to suppress cell proliferation in prostate and breast cancer cell lines (7-9,11,12). Moreover, WWP1 has also been shown to regulate the stability of several cancer-related proteins, prominent among them LATS1, EGFR, HER4, Runx2, JunB, p27, CXCR4, KLF2, and KLF5 (5,13-20). In other cases, some cancer-related proteins are also ubiquitinated by WWP1 without being degraded, though the significance of these mechanisms remains unclear (21-23).

Finally, others and we have previously shown that WWP1 functions as a negative regulator of TGF $\beta$  signaling, which has widespread roles in cancer pathogenesis. WWP1 inhibits TGF $\beta$  signaling by triggering degradation of several active components of this pathway, including the activated TGF $\beta$  type I receptor (T $\beta$ RI). This degradation requires association with the inhibitory Smad, Smad7, which functions as a bridging factor between WWP1 and T $\beta$ RI (24,25).

In our efforts to further characterize the modes of action and regulation of WWP1, we found that this E3 was only able to self-catalyze its monoubiquitination at steady states, and this was correlated with the silencing of its polyubiquitination activity. Mechanistically, we identified an auto-inhibitory mechanism between C2 or WW and Hect whose disruption upon binding to the Smad7/T $\beta$ RI complex switches its monoubiquitination activity to polyubiquitination activity, culminating in degradation of WWP1 itself as well as T $\beta$ RI. From a translational perspective, we provide proof-of-concept experiments demonstrating that this regulatory mechanism is disrupted by a tumor-derived point mutation in WWP1 found in human prostate cancer. Thus by identifying a mechanism of negative regulation of WWP1 enzymatic activity and validating its clinical relevance, these findings yield tantalizing insights into the contribution of this oncogenic ubiquitin ligase to the pathogenesis of human malignancies.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Cell culture and transfection*

HEK293, Hela and MCF-7 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). RWPE-1 cells were maintained in Keratinocyte-SFM medium supplemented with 10% FCS (without tetracycline). To establish doxycycline (Dox)-inducible RWPE-1 cell lines, cells were infected with pLVX-Tet3G encoding the Dox transactivator and selected with G418 (500  $\mu$ g/ml). Cells that express high level of the transactivator were infected with pLVX-TRE3G-Flag-WWP1.WT or pLVX-TRE3G-Flag-WWP1.E798V, selected with puromycin (10

$\mu$ g/ml) and maintained as a single population (RWPE-TR-Flag-WWP1.WT cells and RWPE-TR-Flag-WWP1.E798V cells). Lipofectamine reagent (Life Technologies) and DharmaFECT (GE Dharmacon) were used to transfect plasmids and siRNA respectively, according to the manufacturer's instruction. Cells were also cotransfected with GFP as a control of transfection efficiency.

### *Lentiviral Infections*

To generate the lentiviruses producing the transactivator, pLVX-Tet3G was transfected into HEK293T cells along with the packaging mix and high-titer lentiviruses were purified by centrifugation following the manufacturer's guidelines (Thermo-scientific). A similar strategy was used to generate the lentiviruses pLVX-Flag-WWP1.WT, and pLVX-Flag-WWP1.E798V.

For stable infection, RWPE cells were infected with the lentivirus pLVX-Tet3G in the presence of Polybrene (20  $\mu$ g/ml) and selected with G418 (500  $\mu$ g/ml) for two weeks. Then cells expressing the Tet-transactivator were infected with pLVX-TRE3G, pLVX-TRE3G-Flag-WWP1.WT, or pLVX-TRE3G-Flag-WWP1.E798V in the presence Polybrene (20  $\mu$ g/ml), selected with puromycin (10  $\mu$ g/ml) for two weeks. Resistant colonies were pooled and expanded as single populations.

### *Plasmids and Constructions*

Flag-WWP1, Flag-WWP1.C890A, Flag-Hect, Flag-WWHect, Flag-Smurfl expression vectors were described previously (24). Expression vectors for HA-Ub, HA-Ub.K48R and HA-Ub.K63R were a gift from Dr. Ivan Dikic. Flag-Smurf2 was purchased from Addgene (ID 11746/ Dr Jeff Wrana's lab). GST-Hect was generated by PCR using p3xFlag-WWP1-Hect and subcloned into pGEX-4T3. Flag-WWP1.E798V, Flag-WWHect.E798V, Flag-WWP1.E798V/C890A, Flag-Hect.E798V, and Flag-Hect.E798V/C890A were generated by substituting the glutamic acid (E) residue at amino acid position 798 for valine (V) using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). HA-WWP1-C2 was generated by subcloning of the HindIII/BamHI insert from 3xFlag-WWP1-C2 into HA-pCMV5. pLVX-TRE3G-Flag-WWP1.WT and pLVX-TRE3G-Flag-WWP1.E798V were generated by

PCR using p3xFlag-WWP1 and p3xFlag-WWP1.E798V and subcloned into pLVX-TRE3G (Clontech). WWP1 $\Delta$ WW1, WWP1 $\Delta$ WW2, WWP1 $\Delta$ WW3, WWP1 $\Delta$ WW4 were generated by deleting individual WW domains or all 4 domains for WWP1 $\Delta$ WW1-4 using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). His-WWP1-C2 was generated by subcloning of the HindIII/XhoI insert from HA-WWP1-C2-pCDNA3 into pET28 vector.

We used On TARGET plus Smartpool siRNAs (L-020068-00) from GE Dharmacon to target Smad7.

#### ***Immunoprecipitation and immunoblotting***

For immunoblotting, cells were lysed at 4°C in TNMG buffer (24) followed by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min at 4°C. Lysates were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. For immunoprecipitation, cells were lysed at 4°C in immunoprecipitation (IP) buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM NaF, 2 mM EGTA, 1 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1% NP-40, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium vanadate and EDTA-free protease inhibitor mixture (Roche Diagnostic) followed by sonication. Cell lysates were precleared using sepharose-coupled protein G for 1 hr and then centrifuged at 6,000 rpm for 10 min at 4°C. Lysates were subjected to immunoprecipitation with the appropriate antibody for 2 hr, followed by adsorption to sepharose-coupled protein G for 1 hr. In all experiments involving ubiquitination, cells were incubated with MG-132 (10  $\mu$ M) for 4 hr before lysis. For His-Ub pull-down, cell lysates were incubated with nickel-NTA-agarose for 1 hr and the beads were washed three times with lysis buffer. Ubiquitinated proteins were then separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies.

The following antibodies were used for immunoblotting or immunoprecipitation: anti-Flag M2-HRP (Sigma), anti-HA-HRP (Roche), anti-Myc-HRP (Roche), anti-ubiquitin (P4D1, Santa Cruz), anti-GAPDH (Cell Signaling), anti-GFP-HRP (Abcam), anti-UbK63 (Enzo), anti-UbK48 (Millipore), anti-His<sub>5</sub>-HRP (Cell signaling), anti-WWP1 (Abnova).

#### ***In vitro ubiquitination assay***

Immunoprecipitated Flag-WWP1 or GST-Hect were incubated in a reaction mixture containing 100 ng E1 (UBE1), 200 ng E2 (UbcH7), 5  $\mu$ g of ubiquitin (Ub) and 1X energy regenerating solution containing ATP and MgCl<sub>2</sub> (all reagents were obtained from Boston Biochem), and reaction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT). Reactions were incubated for 30 min at 37°C. Reactions were stopped by the addition of Laemmli's sample buffer and boiling and were analyzed by western blot.

#### ***Reporter Gene Assays***

Cells were seeded into 12-well plates and transfected 24 hr later with expression vectors by LipofectAMINE. Cells were subsequently treated with TGF- $\beta$ 1 (PeproTech) at 2 ng/ml in medium containing 0.5% FCS for 16 hr. Luciferase assays were performed using the Dual-Luciferase reporter system (Promega). Luciferase activities were normalized to Renilla activities. Prior normalization was performed to obtain the equivalent amounts of wild-type WWP1 and WWP1.E798V.

#### ***Proliferation Assay***

RWPE-TR-Flag-WWP1.WT and RWPE-TR-Flag-WWP1.E.798V cells were plated in 6-well plates and treated with Dox (1  $\mu$ g/ml) for 24 hr prior to addition of TGF $\beta$  (5 ng/ml) in medium containing 0.5% FCS. Cells were then incubated for three or six days with Dox and TGF $\beta$  and counted using the Countess<sup>TM</sup>, Automated Cell Counter (Invitrogen).

#### ***GST Pull-down***

Five  $\mu$ g of bacterially expressed GST or GST-Hect domain were incubated with Glutathione Sepharose beads (GE Healthcare) for 45 min at 4°C and precipitates were washed four times with washing buffer containing PBS supplemented with 250 mM NaCl and 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. Clarified bacterial lysate whose His-C2 expression has been induced or not by IPTG were incubated at 4°C for 1 hr with GST or GST-Hect domain immobilized on Glutathione beads. Beads were then washed with washing buffer and bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using  $\alpha$ -His5-HRP antibody (Cell



signaling). These experiments were repeated three times.

### Statistical Analysis

Results are presented as means  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent experiments. Student's *t*-test analysis was used to determine the difference between the results of wild-type WWP1 with those of the mutant WWP1.E789V. Results are considered statistically significant when \*\**p*-value <0.01 and \*\*\**p*-value <0.001.

## RESULTS

### *WWP1 undergoes monoubiquitination at steady states*

Others and we have previously reported that WWP1 functions as a potent inhibitor of TGF $\beta$  signaling, functioning at least by triggering degradation of the activated T $\beta$ RI in conjunction with Smad7 (24,25). During the course of these previous investigations, we consistently noticed that the WWP1 band in western blotting was accompanied with a slower migrating band whose molecular weight is consistent in size with monoubiquitinated WWP1. To further substantiate this observation, we initially performed an *in vivo* ubiquitination assay to assess formation of the WWP1 ubiquitin-conjugated products in the presence or absence of ubiquitin. We found that coexpressing ubiquitin with WWP1 resulted in a substantial increase in the abundance of the monoubiquitinated WWP1 specie (Fig. 1A). Immunoprecipitation experiment using ubiquitin and WWP1 antibodies showed that endogenous WWP1 can undergo monoubiquitination (Fig. 1B). Extending our study to other two Hect E3 ubiquitin ligases, we found that Smurf2 was mainly monoubiquitinated, whereas Smurf1 is highly polyubiquitinated (Fig. 1A), attesting to the specificity of the monoubiquitination modification observed for WWP1 and Smurf2, and further indicating that the intrinsic ubiquitination of members of the Hect family of ubiquitin ligase are governed by distinct mechanisms despite the strong homology in their structure. During the course of these analyses, we also made use of a mutant WWP1.C890A, in which the active

cysteine in the Hect catalytic domain was mutated to alanine, rendering WWP1 catalytically inactive. In contrast to wild-type WWP1, WWP1.C890A was void of any monoubiquitination activity, suggesting that WWP1 catalyzes its monoubiquitination (Fig. 1C, 1D). To test this directly, we performed an *in vitro* ubiquitination assay using purified WWP1, E1, E2, and ubiquitin in the presence of DTT, which disrupts disulfide bond between cysteines, and thus enabling exclusive detection of covalent attachments, such as those engaged in monoubiquitination or polyubiquitination (Fig. 1D). Under these stringent conditions, we mainly detected monoubiquitinated WWP1, providing further support to the notion that WWP1 undergoes primarily monoubiquitination at basal conditions in the absence of any interaction with molecular partners or any other ubiquitin ligases.

### *Monoubiquitination is correlated with increased WWP1 stability*

We next sought to investigate the impact of monoubiquitination on WWP1 stability and activity, surmising that deleting specific WWP1 functional domains (Fig. 2A) might affect its stability and activity. In fact, a WWP1 construct that is deleted from its C2 and WW domains is less expressed than the full length WWP1 (Fig. 2B). To determine whether this decrease is due to degradation, we performed a pulse-chase experiment in the presence of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX). In contrast to the Hect domain, full-length WWP1 exhibited a slow turnover rate, reinforcing the observation that removal of C2 and WW yields an unstable protein (Fig. 2C). In ubiquitination experiments, WWP1 was barely polyubiquitinated, whereas Hect was highly polyubiquitinated (Fig. 2D). Of note, full-length WWP1 was primarily monoubiquitinated (Fig. 2D). Interestingly, the catalytically inactive mutant Hect.C890A was less polyubiquitinated (Fig. 2E) and degraded (Fig. 2F) than the wild-type Hect, indicating that Hect is mainly auto-polyubiquitinated. An *in vitro* ubiquitin assay using purified GST.Hect produced in bacteria (and hence, in absence of any other E3 ubiquitin ligases source) confirmed the ability of WWP1 Hect to catalyze its own polyubiquitination (Fig. 2G). Altogether, these findings indicate that C2

and/or WW domains inhibit the polyubiquitination of the Hect domain.

K48-linked ubiquitin chains usually target substrates for proteasomal degradation, whereas K63-linked polyubiquitin chains are associated with lysosomal degradation (1). To determine which type of ubiquitin-chains is catalyzed by WWP1, we conducted ubiquitination assays using mutants Ub.K48R or Ub.K63R. Consistent with the literature (26), we found that Hect preferentially catalyzed K63-linked polyubiquitination (Fig. 2H, 2I). However, we observed that Hect was also ubiquitinated through K48-linked polyubiquitination chain, although to a lesser extent as compared to K63-linked polyubiquitination (Fig. 2I, bottom). Finally, we found that Hect was stabilized in cells exposed to MG-132 or leupeptin, which block protein clearance through the proteasome or lysosome, respectively (Fig. 2J). Collectively, these results strongly suggest that WWP1 is monoubiquitinated under steady state conditions, which can be converted to K63- or K48-linked polyubiquitinated specie upon removal of the C2 and WW domains, leading to WWP1 degradation.

#### *C2 and WW domains interfere with WWP1 polyubiquitination*

The results outlined so far suggest that the C2 and/or WW domains play a crucial role in ensuring WWP1 stability. To elucidate how these two domains fulfill their function, we took advantage of published data reporting an intra-molecular interaction between the C2 and Hect domains of Smurf2 that prevents its auto-ubiquitination (27). As WWP1 and Smurf2 are related C2-WW-Hect E3 ubiquitin ligases, we hypothesized that the C2 domain of WWP1 might also bind to and stabilize the Hect domain. As shown in Fig. 3A, immunoprecipitation of lysates from transfected HEK293 cells with anti-HA directed against HA-C2 revealed the presence of Flag-Hect (Fig. 3A), underscoring the existence of an intra-molecular association between the C2 and Hect domains. Using GST-Hect and His-C2 produced in bacteria in an *in vitro* interaction assay indicated that C2 interacted directly with Hect (Fig. 3B). Such intra-molecular interaction appeared to be functional, as expression of increasing amounts of the C2 domain caused a dose-dependent decrease in the abundance of

polyubiquitinated Hect (Fig. 3C). Congruent with this finding, expression of increasing amounts of C2 caused a dose-dependent increase in the expression levels of the Hect domain (Fig. 3D). The C2 domain appeared therefore to exert a protective role against WWP1 degradation, most likely by interacting with and preventing Hect auto-polyubiquitination.

We also investigated whether the WW domains could influence WWP1 stability by assessing its effect on Hect polyubiquitination. Like the C2 domain, preserving the WW domains was also effective at blocking WWP1 auto-polyubiquitination (Fig. 3E). Congruently, deletion of all 4 WW domains caused increased WWP1 polyubiquitination to an extent exceeding that elicited by deletion of the C2 domain (Fig. 3F). Of note, deletion of individual WW domains had little or no effect on WWP1 polyubiquitination (Fig. 3F), underscoring a requirement for all WW domains in WWP1 stabilization. In several attempts, we were not able to detect an interaction between the WW and Hect domains (Fig. 3A), suggesting that the WW domains may stabilize WWP1 by a mechanism that does not rely on an intra-molecular interaction. Collectively, these results indicate that both C2 and WW domains play important roles in promoting WWP1 stability, most likely by inhibiting WWP1 polyubiquitination.

#### *Binding to Smad7 relieves WWP1 auto-inhibition*

Having shown that both C2 and WW domains of WWP1 exert a negative influence on Hect polyubiquitination activity, we next wondered whether the interaction of WWP1 with Smad7 plays a role in regulating WWP1 stability and activity. Since we have previously shown that Smad7 is required for WWP1-induced polyubiquitination and degradation of the activated T $\beta$ RI (24,25), we speculated that binding of Smad7 to WWP1 might relieve the auto-inhibitory interplay between C2 or WW and Hect. Indeed, overexpressing Smad7 resulted in a marked decrease in the WWP1 abundance (Fig. 4A top), whereas overexpressing Smad1, which failed to interact with WWP1 (24), had no effect (Fig. 4A bottom). Silencing of Smad7 by siRNA resulted in increased expression of endogenous WWP1 (Fig. 4B), providing further evidence that the interaction of WWP1 with Smad7 affects

WWP1 stability. Silencing Smad7 in two other cell lines (i.e., MCF-7 and Hela) also increased WWP1 expression, indicating that the Smad7-mediated WWP1 destabilization can occur in several cell types (Fig. 4B). The ability of Smad7 to destabilize WWP1 likely depends on WWP1 enzymatic activity, because Smad7 had little or no effect on the expression levels of the catalytically inactive mutant WWP1.C890A (Fig. 4A). Corroborating this finding, Smad7 expression induced WWP1 polyubiquitination (Fig. 4C). In our efforts to delineate the underlying mechanisms, we found that Smad7 was able to inhibit the association between C2 and Hect domains (Fig. 4D). Likewise, expression of Smad7 dampened the ability of WW domains to block Hect polyubiquitination (Fig. 4E). Collectively, these findings strongly suggest that a physiological function of Smad7 is to disable the auto-inhibitory mechanism between C2 or WW and Hect domains and thereby enforcing WWP1 polyubiquitination and degradation.

*The tumor-derived mutant WWP1.E798V is constitutively active*

Given the prominent role of WWP1 in cancer pathogenesis, we were curious if alterations of WWP1 in human cancer could affect WWP1 stability and activity. To probe this possibility, we turned our attention on a mutant detected in a prostate cancer that harbors a single-base substitution that replaces a glutamate by a valine at position 798 (WWP1.E798V) (7). Crucially, WWP1.E798V displayed a dramatic increase in polyubiquitination as compared to the wild-type counterpart (Fig. 5A). To rule out the possibility that the WWP1.E798V mutant affects the folding of WWP1, which could conceivably lead to its constitutive polyubiquitination and degradation, we introduced the mutation C890A into WWP1.E798V, creating a catalytically inactive mutant, WWP1.E798V/C890A. As shown in Fig. 5B, the double mutant was defective in its polyubiquitination, suggesting that the constitutive polyubiquitination of WWP1.E798V may stem from its auto-polyubiquitination activity rather than the activity of other ubiquitin ligases that govern clearance of unfolded proteins. Introducing the mutation C890A into Hect.E798V also resulted in protein

stabilization, confirming that Hect.E798V catalyzes its own polyubiquitination (Fig. 5C).

We then attempted to elucidate the mechanism underlying the constitutive auto-polyubiquitination activity of WWP1.E798V, focusing here again on the interaction between the C2 and Hect domains. When compared to the wild-type Hect, the Hect.E798V displays reduced affinity for the C2 domain (Fig. 5D). Likewise, E798V also compromised WW's ability to oppose Hect auto-polyubiquitination (Fig. 5E). Overall, these findings provide a molecular basis that could account for the constitutive auto-polyubiquitin activity of the tumor-derived mutant WWP1.E798V.

Next, we sought to investigate whether the increased auto-polyubiquitination activity of WWP1.E798V mutant is associated with increased ubiquitin ligase activity towards T $\beta$ RI in the presence of Smad7, which is known to mediate the association between WWP1 and T $\beta$ RI (24,25). Because WWP1.E798V is less expressed than wild-type WWP1 due to its constitutive polyubiquitination and degradation, we first performed titration experiments to determine the concentration of WWP1.E798V plasmid that yields the same expression level as wild-type WWP1. As anticipated, coexpression of Smad7 with WWP1 decreased the expression of the activated T $\beta$ RI (Fig. 6A). More crucially, this effect was more pronounced when WWP1.E798V was used instead of wild-type WWP1, in particular with small amounts that were not sufficient for wild-type WWP1 to induce degradation of the activated T $\beta$ RI. We also found that WWP1.E798V was more potent than wild-type WWP1 at inducing accumulation of polyubiquitin-conjugated T $\beta$ RI (Fig. 6B). This scenario is physiologically meaningful, since WWP1.E798V, even less expressed, was more effective than wild type WWP1 at suppressing TGF $\beta$ -induced transcriptional responses, as gauged by a TGF $\beta$ -sensitive reporter gene (Fig. 6C). To further investigate the functional relevance of the tumor-derived mutant WWP1.E798V, we generated populations of normal human prostatic epithelial RWPE cells expressing Doxycyclin (Dox)-inducible WWP1.WT or WWP1.E798V. Upon Dox treatment, we observed that the expression level of WWP1.E798V was much more lower than that

of wild type WWP1 (Fig. 6D). Exposure of these cells to MG-132 increased expression of WWP1.E798V to a level approaching that of wild-type WWP1 (Fig. 6E), confirming the constitutive auto-polyubiquitination and degradation of WWP1.E798V (Fig 5A). Given the contribution of the loss of TGF $\beta$  cytosolic signaling to human cancer pathogenesis, we conducted comparative experiments to investigate whether WWP1.E798V could be more potent than WWP1.WT in interfering with TGF $\beta$ -induced growth inhibition. In fact, under conditions in which wild-type WWP1 elicits only a weak response, expression of WWP1.E798V almost completely blocked TGF $\beta$ -induced growth arrest (Fig. 6F). Together, these findings provide compelling evidence that the tumor-derived mutant WWP1.E798V displays elevated ubiquitin ligase activity against itself as well as T $\beta$ RI, unveiling a potential molecular mechanism that could account for WWP1's ability to elicit its oncogenic function during the course of human cancer pathogenesis.

## DISCUSSION

Despite the prominent roles of E3 ubiquitin ligases in regulating biological processes that contribute to the pathogenesis of human cancer and other diseases, the physiological mechanisms that govern their abundance or enzymatic activity remain unclear. Here, we present evidence that the WWP1 activity is maintained in a silent confirmation under steady state conditions owing to an auto-inhibitory mechanism involving either C2 and/or WW and Hect domains. Interestingly, this auto-inhibitory mechanism correlates with WWP1 auto-monoubiquitination instead of auto-polyubiquitination. A potential mechanism could be that both C2 and WW domains exert a steric pressure on the Hect domain, which in turn favors monoubiquitination at the expense of polyubiquitination. Based on our findings, we propose a model in which engagement of WWP1 with the Smad7/T $\beta$ RI complex subsequent to activation of TGF $\beta$  signaling disrupts the molecular interplays between the C2 or WW and Hect domains, causing a decrease in WWP1 monoubiquitination while increasing its auto-polyubiquitination and polyubiquitination of the

activated T $\beta$ RI. The physiological relevance of this regulatory mechanism was ascertained by demonstrating an ability of the tumor-derived point mutant of WWP1.E798V to disrupt the functional interaction between C2 or WW and Hect, a process that culminates in increased WWP1 auto-polyubiquitination and degradation. Such increase in auto-polyubiquitination likely recapitulates a general increase in WWP1.E798V enzymatic activity, as gauged by the enhanced activity against the activated T $\beta$ RI and attendant suppression of TGF $\beta$  signaling. Thus, our findings provide key insights into the mode of regulation of a representative member of the large family of Hect E3 ubiquitin ligases, and further unveil a paradigm behind constitutive activation of WWP1 in human malignancies.

Although members of the C2-WW-Hect subclass of E3 ubiquitin ligases share strong structural homologies, it is becoming increasingly clear that their mode of regulation can vary between members. Along these lines, our study reveals that WWP1 is only able to catalyze its own monoubiquitination at steady states. Comparative experiments showed that this process is not restricted to WWP1, as Smurf2 also displays mainly auto-monoubiquitination in unstimulated cells. In contrast, Smurf1 undergoes mainly polyubiquitination under the same experimental conditions, supporting the hypothesis that the catalytic activity of the Hect E3 ubiquitin ligases might be governed by distinct mechanisms despite the strong homology in their structures. In further support to this notion, the WWP1 and Smurf2 catalytic activities do not seem to be regulated exactly by the same mechanisms, since Wiesner *et al.* have shown that removal of the C2 domain of Smurf2 is sufficient to alleviate the auto-inhibition (27), whereas our study showed that the C2 domain exerted only partial inhibition, and full auto-inhibition requires the presence of WW domains. A similar scenario has been observed for Nedd4-2 and Itch apparently involving an intra-molecular interaction between the WW domains and a PPXY motif within the Hect domain (28,29). Of note, the PPXY motif is also conserved in the WWP1 Hect domain; however we were not able to detect any interaction between WW and Hect domains of WWP1. Although we cannot rule out the possibility that our experimental conditions preclude the detection of such intra-molecular



interaction, our finding is in agreement with published observations on Smurf2, which also possesses the PPXY motif, but this does not seem to interact with Hect (27). Given that these E3 ubiquitin ligases possess various numbers of WW domains (i.e., WWP1: 4 WW; Smurf1: 2 WW; Smurf2: 3 WW), one would speculate that these molecular features might enable engagement of the ubiquitin ligases with different partners and/or substrates, which cooperate together to fine-tune the ubiquitin ligase catalytic activity.

So far, there is no consensus for the type of ubiquitin linkages that WWP1 is able to conjugate on its substrates and the consequence of this ubiquitination on substrate outcome. Indeed, many published studies described various consequences of the WWP1 induced-ubiquitination depending on the substrates, including proteasomal degradation, lysosomal degradation, subcellular redistribution, and transcriptional activity (5,22,23,30,31). Here, we found that WWP1 conjugated its polyubiquitination mainly through Lys63-polyubiquitin chains, although we can clearly detect Lys48-linked polyubiquitination. In light of the abundant literature that Lys63 and Lys48 polyubiquitination linkages are respectively associated with lysosomal and proteasomal degradation, we suggest that WWP1 may trigger its degradation through the proteasome and/or lysosomal pathways. Consistent with this hypothesis, degradation of the WWP1 Hect domain was blocked by both MG-132 and leupeptin, which inhibit the proteasome and lysosome, respectively. Because modification of substrates by Lys63-polyubiquitin chains plays other roles unrelated to protein degradation (1), we cannot rule out the possibility that the Hect domain of WWP1 might also regulate its activity by coordinating other mechanisms, such as subcellular redistribution or interaction with substrates or partners.

A wealth of data postulates that WWP1 functions as an oncogenic ubiquitin ligase, likely because of its genomic amplification and/or overexpression in prostate and breast cancers (3,5). Intriguingly, a previous study revealed the presence of a point mutation in WWP1 in human prostate cancer, raising the intriguing question of whether mutational alteration of WWP1 could contribute to human cancer pathogenesis (7). It is

in this respect that our present findings provide insights into the impact of WWP1 mutational alteration on cancer development. Of particular importance, we found that the tumor-derived mutation WWP1.E798V displayed increased activity, which ultimately disrupts the TGF $\beta$  cytosolic signaling, as evidenced using the human normal prostatic cell line RWPE. In light of these findings, it would be interesting to determine whether the mutant WWP1.E798V displays constitutive ubiquitin ligase activity towards cancer-related genes other than T $\beta$ RI, a finding that will likely improve our understanding of the oncogenic role of WWP1 in human cancer. Likewise, it would also be interesting to determine whether a similar prostate cancer-derived mutation occurs in other human malignancies. Therefore, our findings open up attractive molecular frameworks that could be exploited to unravel mechanistic paradigms of human malignancies and applying these concepts to implement accurate and safe therapeutic strategies.

To the best of our knowledge, our findings reveal for the first time that a point mutation in a Hect ubiquitin ligase culminates in a constitutive ubiquitin ligase activity. Many point mutations in other families of signaling proteins, such as kinases, GTPases, phosphatases, or transcription factors have been described and extensively studied, although these alterations usually affect a specific cellular process. As such, our functional characterization of a tumor-derived mutation in a representative member of the Hect superfamily emphasizes another important layer of complexity to the etiology of human cancer that deserves particular attention, as protein degradation represents a universal system that simultaneously keeps in check the abundance of many proteins, including the most prominent oncogenes and tumor suppressor genes. We anticipate that targeting Hect ubiquitin ligases, such as WWP1, could represent an innovative strategy to curb aberrations in many signaling pathways that typically accumulate over time during the course of cancer development and progression.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. Simona Polo for helpful discussion. We thank Dr. Ivan Dikic for providing plasmids.

This work was supported by grants from “La Ligue Contre le Cancer”, “Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC)”, France to Azeddine Atfi. Thomas Courivaud was supported by a doctoral fellowship from “La Ligue Nationale Contre le Cancer” and “l’Association pour la Recherche contre le Cancer”, France.

# CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

# AUTHORS CONTRIBUTION

TC and NF designed, performed and analyzed most of the experiments. AE and SK designed, performed and analyzed the experiments shown in Figures 6D, 6E, 6F. LL and OF contributed to the management and design of the project. CP and AA designed the study and wrote the paper. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

# REFERENCES

1. Komander, D., and Rape, M. (2012) The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* **81**, 203-229
2. Kravtsova-Ivantsiv, Y., and Ciechanover, A. (2012) Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. *J Cell Sci* **125**, 539-548
3. Bernassola, F., Karin, M., Ciechanover, A., and Melino, G. (2008) The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell* **14**, 10-21
4. Rotin, D., and Kumar, S. (2009) Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 398-409
5. Zhi, X., and Chen, C. (2012) WWP1: a versatile ubiquitin E3 ligase in signaling and diseases. *Cell Mol Life Sci* **69**, 1425-1434
6. Verdecia, M. A., Joazeiro, C. A., Wells, N. J., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Hunter, T., and Noel, J. P. (2003) Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase. *Molecular cell* **11**, 249-259
7. Chen, C., Sun, X., Guo, P., Dong, X. Y., Sethi, P., Zhou, W., Zhou, Z., Petros, J., Frierson, H. F., Jr., Vessella, R. L., Atfi, A., and Dong, J. T. (2007) Ubiquitin E3 ligase WWP1 as an oncogenic factor in human prostate cancer. *Oncogene* **26**, 2386-2394
8. Chen, C., Zhou, Z., Ross, J. S., Zhou, W., and Dong, J. T. (2007) The amplified WWP1 gene is a potential molecular target in breast cancer. *Int J Cancer* **121**, 80-87
9. Chen, C., Zhou, Z., Sheehan, C. E., Slodkowska, E., Sheehan, C. B., Boguniewicz, A., and Ross, J. S. (2009) Overexpression of WWP1 is associated with the estrogen receptor and insulin-like growth factor receptor 1 in breast carcinoma. *Int J Cancer* **124**, 2829-2836
10. Nguyen Huu, N. S., Ryder, W. D., Zeps, N., Flasz, M., Chiu, M., Hanby, A. M., Poulson, R., Clarke, R. B., and Baron, M. (2008) Tumour-promoting activity of altered WWP1 expression in breast cancer and its utility as a prognostic indicator. *J Pathol* **216**, 93-102
11. Zhou, Z., Liu, R., and Chen, C. (2012) The WWP1 ubiquitin E3 ligase increases TRAIL resistance in breast cancer. *Int J Cancer* **130**, 1504-1510

12. Li, Y., Zhou, Z., and Chen, C. (2008) WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1 targets p63 transcription factor for ubiquitin-mediated proteasomal degradation and regulates apoptosis. *Cell Death Differ* **15**, 1941-1951
13. Yeung, B., Ho, K. C., and Yang, X. (2013) WWP1 E3 ligase targets LATS1 for ubiquitin-mediated degradation in breast cancer cells. *PLoS One* **8**, e61027
14. Chen, C., Zhou, Z., Liu, R., Li, Y., Azmi, P. B., and Seth, A. K. (2008) The WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 upregulates ErbB2 and EGFR through RING finger protein 11. *Oncogene* **27**, 6845-6855
15. Feng, S. M., Muraoka-Cook, R. S., Hunter, D., Sandahl, M. A., Caskey, L. S., Miyazawa, K., Atfi, A., and Earp, H. S., 3rd. (2009) The E3 ubiquitin ligase WWP1 selectively targets HER4 and its proteolytically derived signaling isoforms for degradation. *Mol Cell Biol* **29**, 892-906
16. Jones, D. C., Wein, M. N., Oukka, M., Hofstaetter, J. G., Glimcher, M. J., and Glimcher, L. H. (2006) Regulation of adult bone mass by the zinc finger adapter protein Schnurri-3. *Science* **312**, 1223-1227
17. Zhao, L., Huang, J., Zhang, H., Wang, Y., Matesic, L. E., Takahata, M., Awad, H., Chen, D., and Xing, L. (2011) Tumor necrosis factor inhibits mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts via the ubiquitin E3 ligase Wwp1. *Stem Cells* **29**, 1601-1610
18. Shu, L., Zhang, H., Boyce, B. F., and Xing, L. (2013) Ubiquitin E3 ligase Wwp1 negatively regulates osteoblast function by inhibiting osteoblast differentiation and migration. *J Bone Miner Res* **28**, 1925-1935
19. Chen, C., Sun, X., Guo, P., Dong, X. Y., Sethi, P., Cheng, X., Zhou, J., Ling, J., Simons, J. W., Lingrel, J. B., and Dong, J. T. (2005) Human Kruppel-like factor 5 is a target of the E3 ubiquitin ligase WWP1 for proteolysis in epithelial cells. *J Biol Chem* **280**, 41553-41561
20. Zhao, D., Zhi, X., Zhou, Z., and Chen, C. (2012) TAZ antagonizes the WWP1-mediated KLF5 degradation and promotes breast cell proliferation and tumorigenesis. *Carcinogenesis* **33**, 59-67
21. Zaarour, R. F., Chirivino, D., Del Maestro, L., Daviet, L., Atfi, A., Louvard, D., and Arpin, M. (2012) Ezrin ubiquitylation by the E3 ubiquitin ligase, WWP1, and consequent regulation of hepatocyte growth factor receptor activity. *PLoS One* **7**, e37490
22. Peschiaroli, A., Scialpi, F., Bernassola, F., El Sherbini el, S., and Melino, G. (2010) The E3 ubiquitin ligase WWP1 regulates DeltaNp63-dependent transcription through Lys63 linkages. *Biochemical and biophysical research communications* **402**, 425-430
23. Laine, A., and Ronai, Z. (2007) Regulation of p53 localization and transcription by the HECT domain E3 ligase WWP1. *Oncogene* **26**, 1477-1483
24. Seo, S. R., Lallemand, F., Ferrand, N., Pessah, M., L'Hoste, S., Camonis, J., and Atfi, A. (2004) The novel E3 ubiquitin ligase Tiul1 associates with TGIF to target Smad2 for degradation. *The EMBO journal* **23**, 3780-3792
25. Komuro, A., Imamura, T., Saitoh, M., Yoshida, Y., Yamori, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2004) Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene* **23**, 6914-6923
26. Maspero, E., Valentini, E., Mari, S., Cecatiello, V., Soffientini, P., Pasqualato, S., and Polo, S. (2013) Structure of a ubiquitin-loaded HECT ligase reveals the molecular basis for catalytic priming. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 696-701

27. Wiesner, S., Ogunjimi, A. A., Wang, H. R., Rotin, D., Sicheri, F., Wrana, J. L., and Forman-Kay, J. D. (2007) Autoinhibition of the HECT-type ubiquitin ligase Smurf2 through its C2 domain. *Cell* **130**, 651-662
28. Gallagher, E., Gao, M., Liu, Y. C., and Karin, M. (2006) Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 1717-1722
29. Bruce, M. C., Kanelis, V., Fouladkou, F., Debonneville, A., Staub, O., and Rotin, D. (2008) Regulation of Nedd4-2 self-ubiquitination and stability by a PY motif located within its HECT-domain. *Biochem J* **415**, 155-163
30. Subik, K., Shu, L., Wu, C., Liang, Q., Hicks, D., Boyce, B., Schiffhauer, L., Chen, D., Chen, C., Tang, P., and Xing, L. (2012) The ubiquitin E3 ligase WWP1 decreases CXCL12-mediated MDA231 breast cancer cell migration and bone metastasis. *Bone* **50**, 813-823
31. Lin, X. W., Xu, W. C., Luo, J. G., Guo, X. J., Sun, T., Zhao, X. L., and Fu, Z. J. (2013) WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 (WWP1) negatively regulates TLR4-mediated TNF-alpha and IL-6 production by proteasomal degradation of TNF receptor associated factor 6 (TRAF6). *PLoS One* **8**, e67633

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1: WWP1 is monoubiquitinated at steady states

(A) HEK293 cells were transfected with His-Ub together with Flag-WWP1, Flag-Smurf1 or Flag-Smurf2. Cell lysates were pulled-down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-Flag antibody.

(B) HEK293 cell lysates were immunoprecipitated with anti-ubiquitin (Ub) antibody or control anti-IgG antibody followed by immunoblotting with anti-WWP1 antibody. Mr, molecular weight marker.

(C) HEK293 cells were transfected with His-Ub together with Flag-WWP1 or the catalytically inactive mutant Flag-WWP1.C890A. Cell lysates were pulled-down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-Flag antibody.

(D) Flag-WWP1 or Flag-WWP1.C890A was purified using anti-Flag-agarose beads before being incubated with Ubiquitin (Ub), UBE1 (E1) and UbcH7 (E2), and ATP. *In vitro* ubiquitination reaction was then performed at 37°C for 30 min. Ubiquitinated WWP1 was visualized by immunoblotting with anti-Flag antibody.

### Figure 2: Full length WWP1 is more stable than the Hect domain

(A) Schematic representation of the functional domains of WWP1.

(B, C) HEK293 cells were transfected with Flag-WWP1 or Flag-Hect. (B) Cell lysates were immunoblotted with anti-Flag antibody to detect the expression of full length WWP1 (WWP1.FL) or Hect and with anti-GFP antibody to assess transfection efficiency. (C) Cells were treated with cycloheximide (CHX), and harvested at the indicated time points for immunoblotting analysis to assess the expression levels of Flag-WWP1 or Flag-Hect.

(D) Cells were transfected with His-Ub together with Flag-WWP1 or Flag-Hect. Cell lysates were pulled-down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-Flag antibody.

(E) HEK293 cells were transfected with His-Ub together with Flag-Hect or the catalytically inactive mutant Flag-Hect.C890A. Cell lysates were pulled-down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-Flag antibody.

(F) HEK293 cells were transfected with Flag-Hect or Flag-Hect.C890A and treated with MG-132 (10  $\mu$ M) for 4 hr. Cell lysates were subjected to immunoblotting with anti-Flag antibody to assess the expression levels of Flag-Hect or Flag-Hect.C890A.

(G) *In vitro* ubiquitination reaction using bacterially expressed GST-Hect or GST alone was performed in the presence of Ub, E1, E2, and ATP. Ubiquitinated Hect was visualized by immunoblotting using anti-ubiquitin antibody. The blot was stained with Ponceau prior to immunoblotting in order to visualize the amount of GST proteins loaded.

(H and I) Expression vectors encoding Flag-Hect together with HA-Ub.WT, HA-Ub.K48R or HA-Ub.K63R mutants were transfected into HEK293 cells and cell lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-HA antibody before being analyzed by immunoblotting with anti-Flag antibody (H, Top) or immunoprecipitated with anti-Flag antibody before being analyzed by immunoblotting with anti-UbK48 antibody that specifically recognizes K48-linked polyubiquitination chains (H, bottom) or anti-UbK63 antibody that specifically recognizes K63-linked polyubiquitination chains (I).

(J) HEK293 cells were transfected with Flag-WWP1 or Flag-Hect and treated with MG-132 (10  $\mu$ M) for 4 hr or with leupeptin (100  $\mu$ g/ml) for 4 hr. Cell lysates were subjected to immunoblotting with anti-Flag antibody to assess the expression levels of Flag-WWP1 and Flag-Hect.

### **Figure 3: C2 and WW domains inhibit WWP1 auto-polyubiquitination**

(A) HA-C2, HA-WW and Flag-Hect were transfected into HEK293 cells and cell lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-HA antibody before being analyzed by immunoblotting with anti-Flag antibody.

(B) Glutathione Sepharose-immobilized GST or GST-Hect (GST-PD) were incubated with clarified bacterial lysates whose His-C2 expression has been induced or not with IPTG. C2 domain binding to the Hect domain was detected by immunoblotting with anti-His antibody. Equivalent GST, GST-Hect and His-C2 were confirmed by Ponceau staining and immunoblotting with anti-His antibody, respectively.

(C) HEK293 cells were transfected with Flag-Hect together with His-Ub and increasing amounts of HA-C2. Cell lysates were pulled-down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-Flag antibody.

(D) HEK293 cells were transfected with Flag-Hect together with increasing amounts of Flag-C2. Cell lysates were immunoblotted with anti-Flag antibody to detect the expression of Hect and C2.

(E) Full-length WWP1 or the indicated fragments of WWP1 were transfected into HEK293 cells together with His-Ub. Cell lysates were pulled-down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-Flag antibody.

(F) Full-length WWP1 or the indicated WW1 $\Delta$ WW mutants were transfected into HEK293 cells together with His-Ub. Cell lysates were pulled-down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-Flag antibody.

#### **Figure 4: Smad7 relieves WWP1 auto-inhibition**

(A) HEK293 cells were transfected with either Flag-WWP1 or Flag-WWP1.C890A in the presence of increasing amounts of Smad7 (Top). HEK293 cells were transfected with Flag-WWP1 in the presence of increasing amounts of Smad7 or Smad1 (Bottom). Cells were also cotransfected with GFP as a control of transfection efficiency. Cell lysates were immunoblotted with anti-Flag antibody to detect the expression of WWP1 or WWP1.C890A and with anti-GFP-HRP to detect the expression of GFP.

(B) HEK293, Hela and MCF-7 cells were transfected with a non-targeting siRNA (siNT) or pool of siRNAs targeting Smad7, siSmad7. The expression of endogenous WWP1 and Smad7 was monitored by direct immunoblotting using anti-WWP1 or anti-Smad7 antibodies.



(C) HEK293 cells were transfected with His-Ub together with Flag-WWP1 and increasing amounts of HA-Smad7. Cell lysates were pulled down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-Flag antibody.

(D) HEK293 cells were transfected with HA-C2 and Flag-Hect together with increasing amounts of Myc-Smad7. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-Flag antibody and then immunoblotted with anti-HA antibody.

(E) HEK293 cells were transfected with His-Ub together with Flag-WWHect and increasing amounts of HA-Smad7. Cell lysates were pulled down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-Flag antibody.

**Figure 5: The tumor-derived mutant WWP1.E798V is unstable**

(A, B) HEK293 cells were transfected with His-Ub and either Flag-WWP1.WT or Flag-WWP1.E798V (A), or either Flag-WWP1.E798V or Flag-WWP1.E798V/C890A (B). Cell lysates were pulled-down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-Flag antibody.

(C) HEK293 cells were transfected with Flag-Hect.E798V or Flag-Hect.E798V/C890A and treated with MG-132 (10  $\mu$ M) for 4 hr. Cell lysates were subjected to immunoblotting with anti-Flag antibody to assess the expression levels of Flag-Hect.E798V or Flag-Hect.E798V/C890A.

(D) HA-C2 and either Flag-Hect or Flag-Hect.E798V were transfected into HEK293 cells and cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-HA antibody before being analyzed by immunoblotting using anti-Flag antibody.

(E) HEK293 cells were transfected with His-Ub and either Flag-WWHect.WT or Flag-WWHect.E798V. Cell lysates were pulled-down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-Flag antibody.



**Figure 6: WWP1.E798V is more active than wild-type WWP1**

(A) HEK293 cells were transfected with the activated T $\beta$ RI (HA-T $\beta$ RI\*) and Smad7 together with Flag-WWP1.WT or Flag-WWP1.E798V. Cell lysates were immunoblotted with anti-HA antibody to detect the expression levels of HA-T $\beta$ RI\*.

(B) HEK293 cells were transfected with His-Ub together with Smad7 and either increasing amounts of Flag-WWP1.WT or Flag-WWP1.E798V. Cell lysates were pulled-down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-HA antibody.

(C) HEK293 cells were transfected with the reporter construct (CAGA)<sub>9</sub>-Lux and increasing amounts of either Flag-WWP1.WT or Flag-WWP1.E798V and treated with TGF $\beta$  for 16 hr. The results are expressed as mean  $\pm$  SD of triplicates from a representative experiment performed three times. Student's-t test was performed and significant differences between wild-type WWP1 and WWP1.E798V are indicated.

(D) RWPE-TR-Flag-WWP1.WT and RWPE-TR-Flag-WWP1.E.798V cells were treated with Dox for 24 hr. Cell lysates were immunoblotted with anti-Flag antibody to detect WWP1.WT and WWP1.E798V.

(E) RWPE-TR-Flag-WWP1.WT and RWPE-TR-Flag-WWP1.E.798V cells were treated with Dox for 1 hr in presence or not of MG-132 (10  $\mu$ M). Cell lysates were immunoblotted with anti-Flag antibody to detect WWP1.WT and WWP1.E798V.

(F) RWPE-TR-Flag-WWP1.WT and RWPE-TR-Flag-WWP1.E.798V cells were first treated with Dox for 24 hr and then cultured with or without TGF $\beta$  (5 ng/ml) and Dox for 3 days or 6 days. Rate of cell proliferation was assessed by determining the cell numbers using an automatic cell counter and expressed as a percentage of control. The results are expressed as mean  $\pm$  SD of triplicates from a representative experiment performed three times. Student's-t test was performed and significant differences between WWP1 and control as well as between wild-type WWP1 and WWP1.E798V are reported.

Figure 1

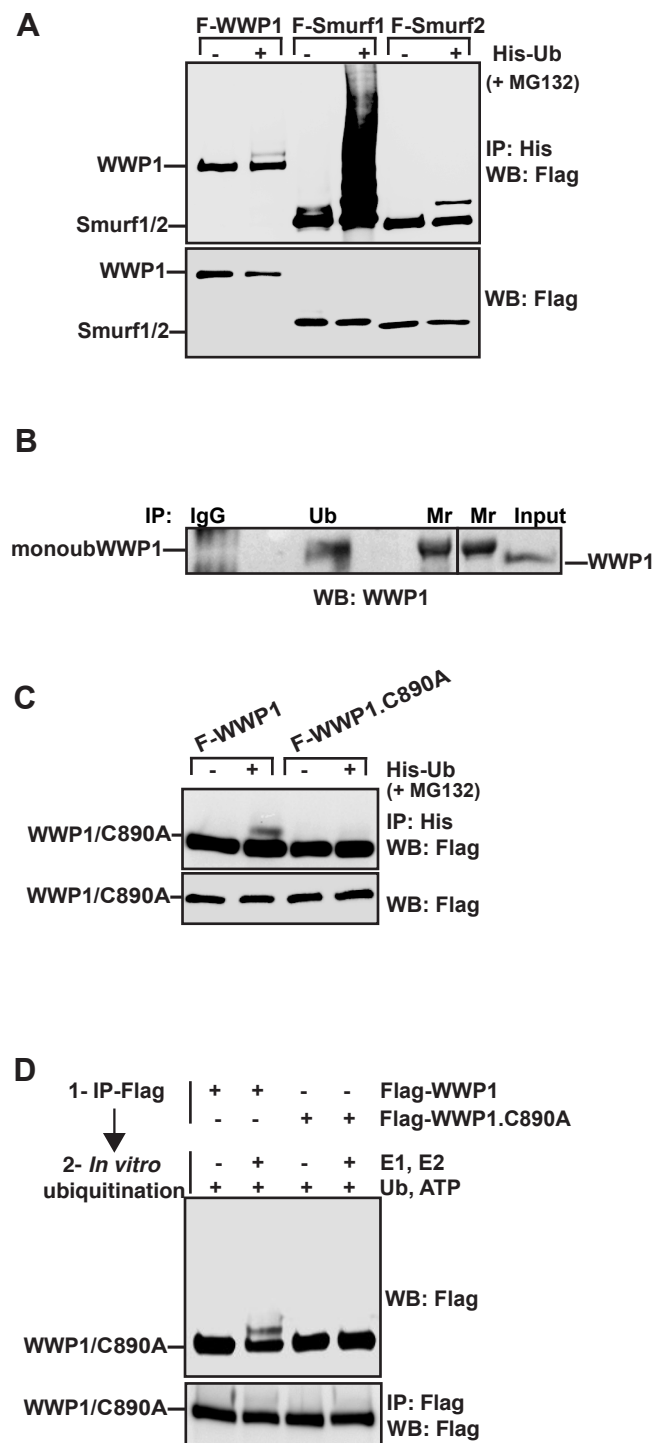
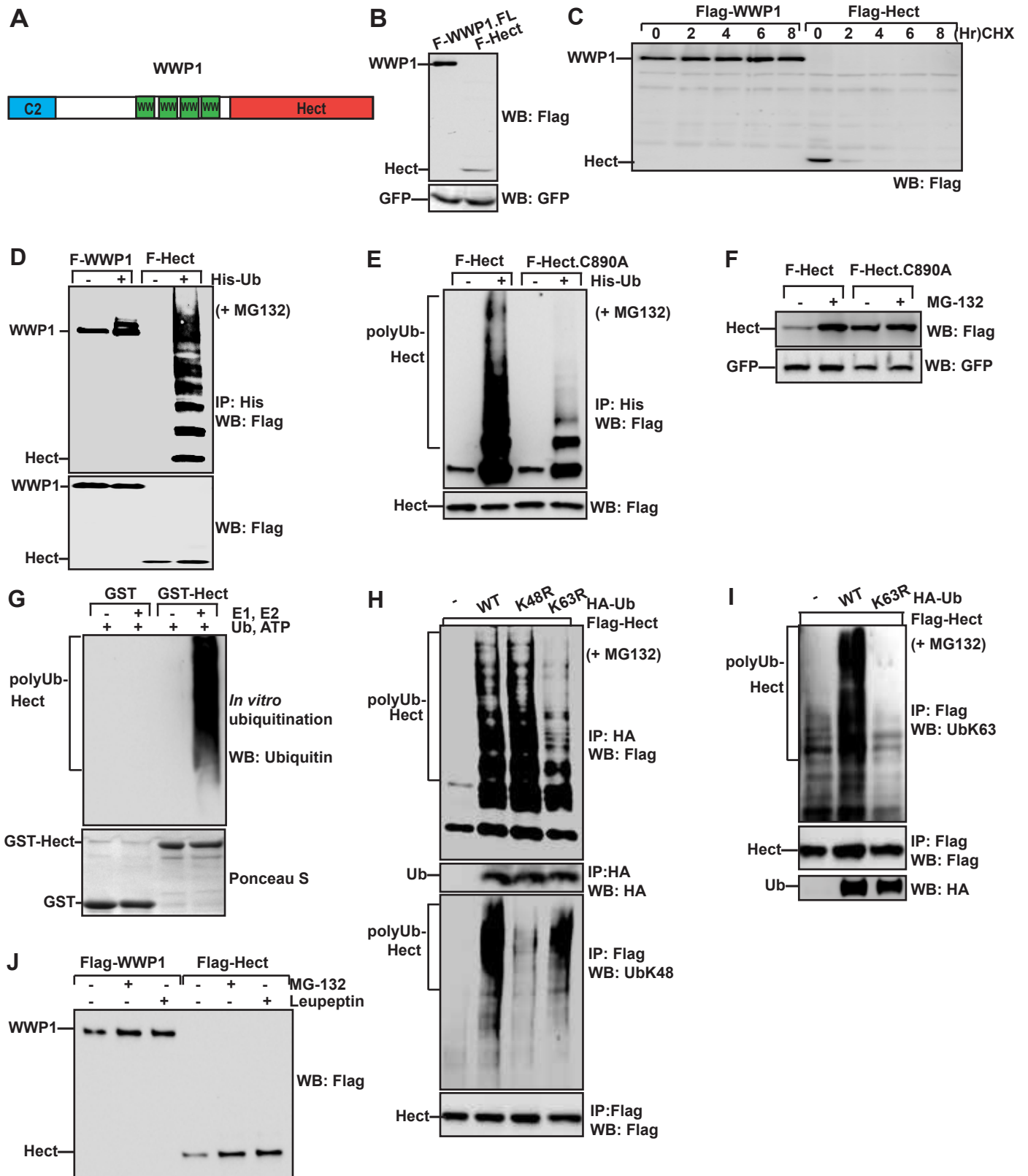
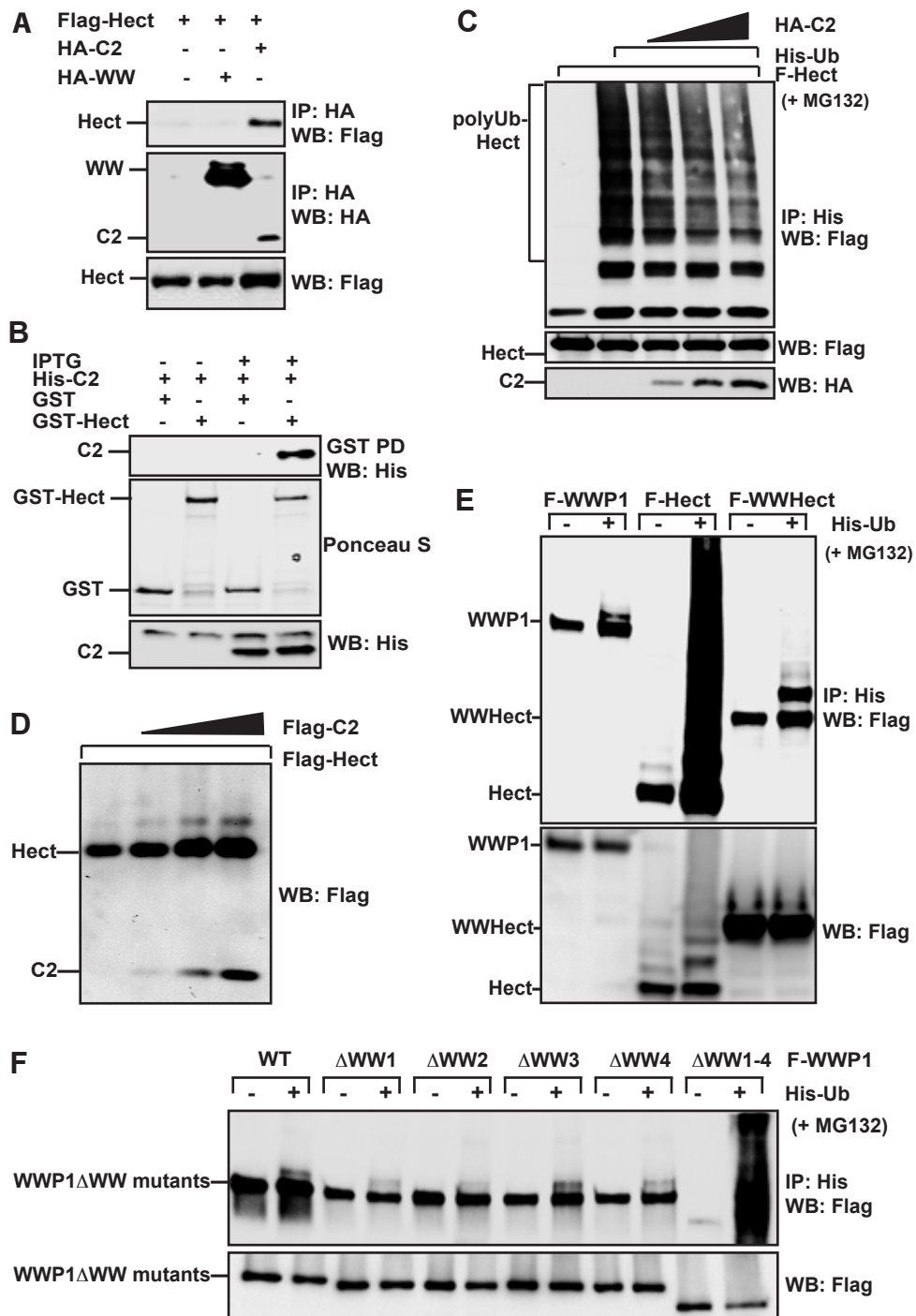


Figure 2



**Figure 3**



**Figure 4**

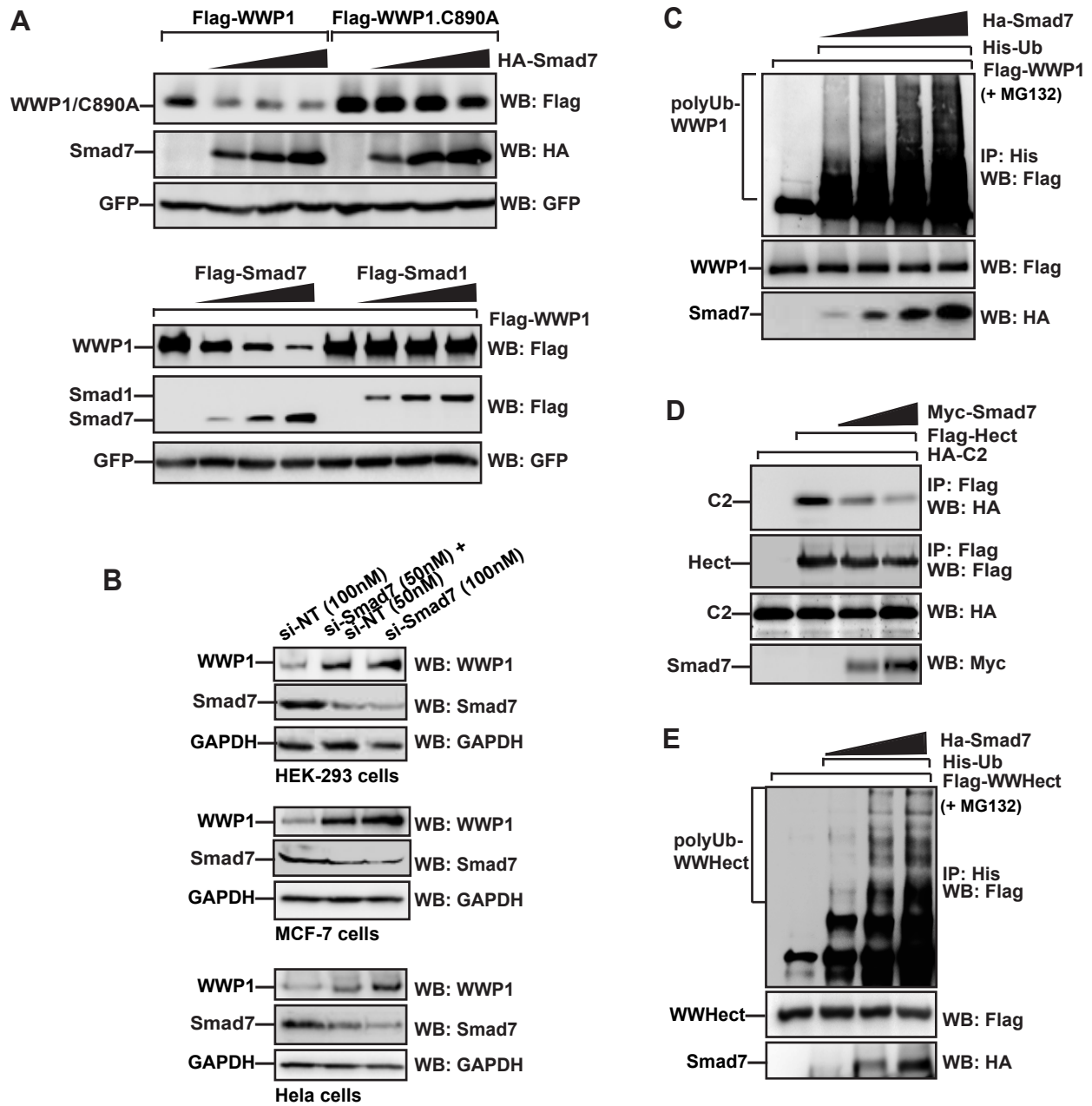


Figure 5

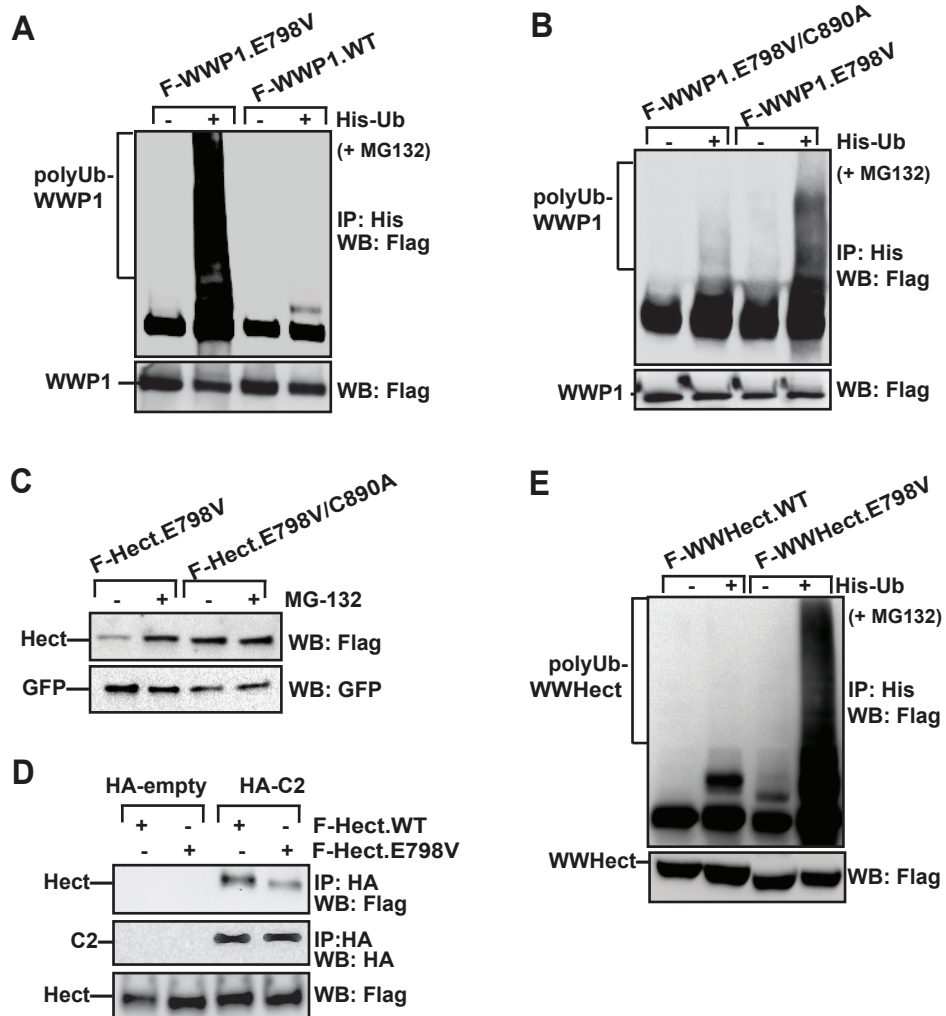
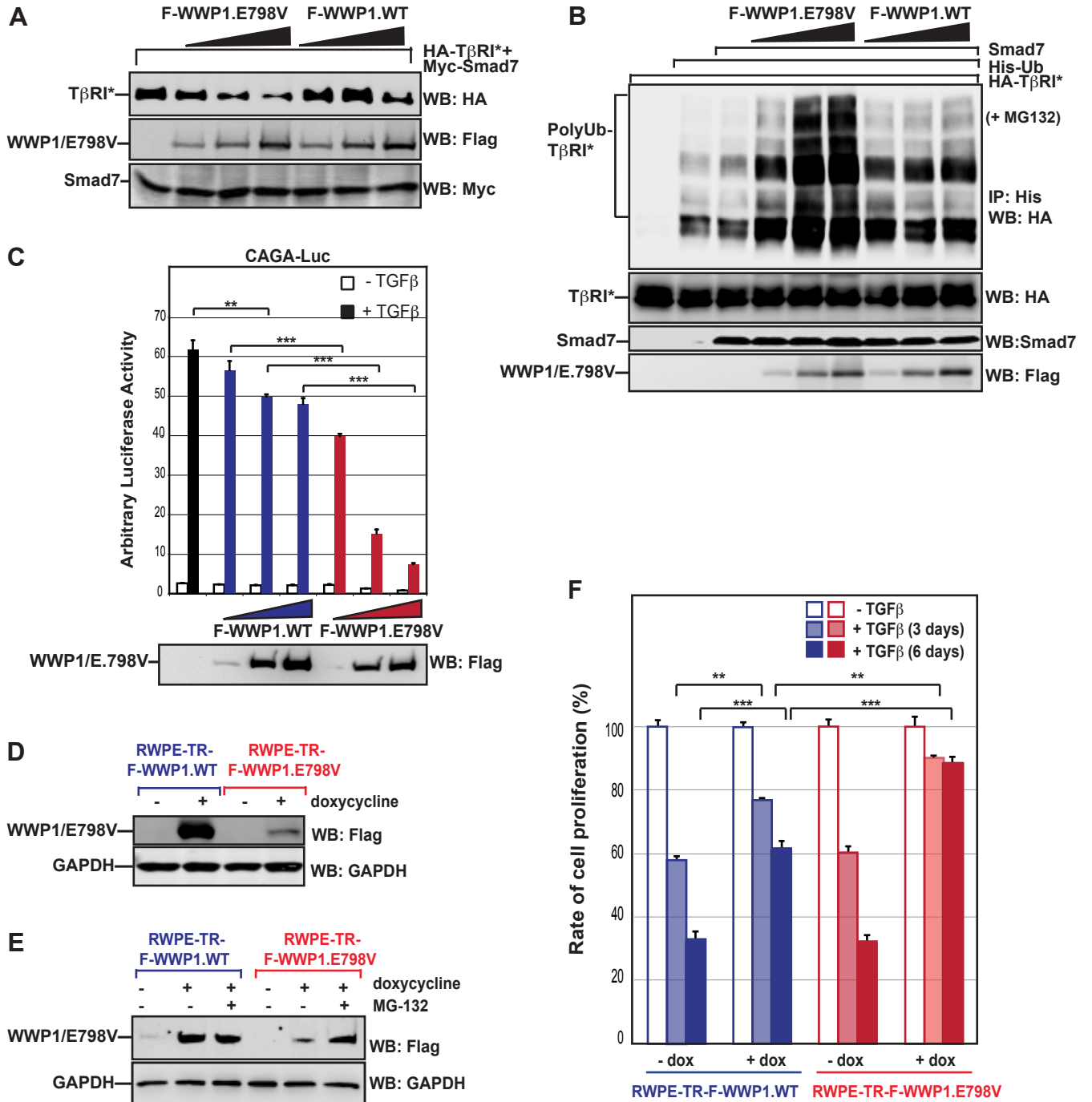
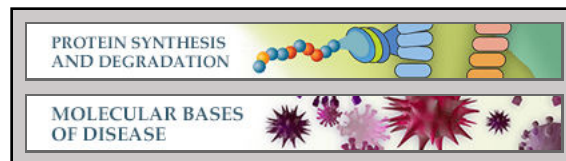


Figure 6



**Protein Synthesis and Degradation:**  
**Functional characterization of a**  
**WWP1/Tiul1 tumor-derived mutant reveals**  
**a paradigm of its constitutive activation in**  
**human cancer**

Thomas Courivaud, Nathalie Ferrand,  
Abdelouahid Elkhattouti, Santosh Kumar,  
Laurence Levy, Olivier Ferrigno, Azeddine  
Atfi and Celine Prunier  
*J. Biol. Chem.* published online July 7, 2015



Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M115.642314](https://doi.org/10.1074/jbc.M115.642314)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](#).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 0 references, 0 of which can be accessed free at  
<http://www.jbc.org/content/early/2015/07/07/jbc.M115.642314.full.html#ref-list-1>



## Projet 2 : Caractérisation d'un mécanisme d'action de WWP1 avec son nouveau partenaire STARD13

---

### Résumé de l'article 2

« WWP1 and STARD13 function in partnership to target active RhoA for degradation »

Mon deuxième projet de thèse a consisté à identifier de nouveaux mécanismes moléculaires mis en jeu par WWP1 qui permettraient de mieux décrypter son rôle lors des processus cancéreux. Pour cela, mon laboratoire a cherché à découvrir de nouvelles protéines interagissant avec WWP1, qui pourraient être des régulateurs, des substrats ou des adaptateurs de WWP1. Dans ce contexte, un crible double-hybride a été réalisé chez la levure avec comme appât WWP1 et a permis d'identifier la protéine STARD13 (Star-Related lipid transfer Domain containig 13) comme un nouveau partenaire potentiel de WWP1. STARD13 est une protéine possédant une activité RhoGAP (Rho-GTPase-Activating Protein) qui lui permet d'inactiver les RhoGTPases en stimulant leur activité GTPasique intrinsèque. STARD13 exerce son activité RhoGAP essentiellement vis à vis de RhoA, un acteur majeur de la réorganisation du cytosquelette d'actine impliqué dans les processus biologiques normaux mais aussi pathologiques comme dans les cancers. STARD13 est d'ailleurs actuellement décrit dans la littérature comme une protéine suppresseur de tumeur puisque son expression est diminuée dans plusieurs types de cancers, notamment dans les cancers du sein, et qu'elle est capable d'inhiber la croissance et la migration de plusieurs types cellulaires (**cf. Chapitre IV/ III. B.**). Au regard de toutes ces données, il nous a paru intéressant de décrypter les conséquences moléculaires et fonctionnelles de l'interaction entre WWP1 et STARD13 dans la cellule.

Mes travaux ont permis de montrer que STARD13 s'associait avec WWP1 également dans des cellules eucaryotes. L'interaction entre WWP1 et STARD13 a notamment été confirmée dans des conditions endogènes dans la lignée cellulaire cancéreuse mammaire MCF7. Nous avons aussi identifié les domaines d'interaction entre WWP1 et STARD13 : il

s'agit du domaine d'ancrage à la membrane C2 pour WWP1 et du domaine de liaison lipidique START pour STARD13.

Concernant la fonction du complexe WWP1/STARD13, nous avons d'abord émis l'hypothèse que STARD13 pouvait être un nouveau substrat de WWP1, WWP1 étant une E3 ubiquitine ligase. Néanmoins, nous n'avons jamais pu observer d'ubiquitination de STARD13 par WWP1, ni même une augmentation du taux de STARD13 dans des cellules où l'expression de WWP1 est diminuée par transfection de siRNA. Ces résultats suggèrent que STARD13 n'est certainement pas un substrat de WWP1 dégradé après son ubiquitination par WWP1.

Mon laboratoire et d'autres ont précédemment montré que WWP1 catalysait l'ubiquitination de certains de ses substrats à l'aide de protéines adaptatrices (Komuro, Imamura et al. 2004, Seo, Lallemand et al. 2004, Moren, Imamura et al. 2005). Smad7 sert par exemple d'adaptateur à WWP1 en permettant à WWP1 de se lier et de polyubiquitiner son substrat T $\beta$ RI activé ainsi qu'en stimulant son activité catalytique. Nous avons alors envisagé l'hypothèse que STARD13 pouvait aussi être une protéine adaptatrice pour WWP1. Sachant que STARD13 possède une activité de RhoGAP envers RhoA, nous avons cherché à savoir si STARD13 pourrait servir d'adaptateur à WWP1 pour polyubiquitiner RhoA. Tout d'abord, nous avons observé que la diminution de l'expression de STARD13 par transfection de siRNA dans des cellules cancéreuses mammaires MDA.MB231 ou MCF-7 entraînait une augmentation du niveau protéique de WWP1. En accord avec ses données, nous avons observé que STARD13 induisait la polyubiquitination de WWP1, qui reflète l'augmentation de son activité ligase. Ces résultats suggèrent que STARD13 permet l'activation catalytique de WWP1. STARD13 pourrait donc, comme Smad7, agir comme une protéine adaptatrice de WWP1.

Nous avons ensuite cherché à savoir si WWP1, en coopération avec STARD13, pouvait interagir avec RhoA. Grâce à des expériences de co-immunoprécipitation, nous avons observé une association entre WWP1 et RhoA dans des conditions de surexpression et endogènes. La surexpression de STARD13 favorise cette association de WWP1 avec RhoA, alors que la diminution de l'expression de STARD13 par transfection de siRNA dirigés contre STARD13 inhibe cette association. Nous avons donc ensuite testé si RhoA était un nouveau substrat de WWP1. Nous avons observé que WWP1 induisait la polyubiquitination de RhoA, et que cette polyubiquitination était augmentée en présence de STARD13. Inversement, la polyubiquitination de RhoA n'est plus visible en présence de WWP1 dans des cellules où

l'expression de STARD13 est éteinte par transfection stable d'un shRNA dirigés contre STARD13. Ces résultats suggèrent que STARD13 est nécessaire à l'ubiquitination de RhoA par WWP1. Concernant le rôle de l'ubiquitination de RhoA par WWP1, nous avons montré que la surexpression de WWP1 en combinaison avec STARD13 entraînait une baisse du niveau protéique de RhoA. Ce résultat semble spécifique puisque une telle baisse n'est pas observée pour Cdc42 et Rac1, deux GTPases de la famille des GTPases Rho. L'ensemble de ces résultats suggère donc que STARD13 agit comme un adaptateur pour WWP1. STARD13 permet à WWP1 de s'associer avec RhoA, d'entraîner sa polyubiquitination et sa dégradation.

Nous avons ensuite testé si le complexe WWP1/STARD13 ciblait une forme spécifique de RhoA, c'est à dire la forme activée liée au GTP ou la forme inactive liée au GDP. Le traitement des cellules MCF-7 avec un activateur ou un inhibiteur de RhoA permet d'observer que WWP1 interagit préférentiellement avec la forme activée de RhoA. De même, STARD13 favorise l'interaction de WWP1 uniquement avec la protéine RhoA liée au GTP alors que la diminution de l'expression de STARD13 par transfection de siRNA inhibe l'association de WWP1 avec RhoA activé. Cela suggère que le complexe STARD13/WWP1 cible spécifiquement la forme activée de RhoA. En accord avec ces résultats, STARD13 favorise la polyubiquitination et la dégradation de RhoA activé par WWP1. De plus, la diminution de l'expression de STARD13 ou de WWP1 dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 ou MDA.MB.231 entraîne une augmentation des niveaux endogènes de la forme activée de RhoA. WWP1, en association avec STARD13, entraîne donc préférentiellement la polyubiquitination et la dégradation de la forme activée de RhoA.

Connaissant le rôle fondamental de RhoA dans l'organisation du cytosquelette d'actine, nous nous sommes demandé si WWP1 pouvait induire une réorganisation de l'architecture cellulaire. Des expériences d'immunofluorescence réalisées dans les cellules MCF-7 montrent que les cellules n'exprimant pas WWP1 ont un phénotype arrondi contrairement aux cellules contrôles, et possèdent des bourgeonnements membranaires « blebs », typiques de cellules ayant un fort taux de RhoA activé. Ces cellules présentent également moins de protrusions et un marquage prononcé de l'actine au niveau de leur cortex cellulaire, caractéristique d'une activation de RhoA. La réorganisation du cytosquelette d'actine par RhoA est décrite pour être une étape nécessaire à la migration cellulaire. Nous nous sommes donc intéressé au rôle de WWP1 et STARD13 lors de ce processus. Nous avons observé que des cellules MCF7 et MDA.MB231 dont l'expression de WWP1 ou STARD13 est diminuée par siRNA ou shRNA migrent plus vite que les cellules contrôles. De manière

intéressante, l'augmentation de la migration de ces cellules n'est pas observée lorsqu'elles sont traitées par un inhibiteur de RhoA, suggérant que WWP1 inhibe la migration cellulaire dans les cellules cancéreuses mammaires en dégradant, au moins en partie, RhoA activée.

Ces résultats mettent en évidence pour la première fois que la E3 ubiquitine ligase WWP1 s'associe avec la RhoGAP STARD13 pour permettre la polyubiquitination et la dégradation de la forme activée de RhoA, et décrivent ainsi un nouveau mécanisme d'action de WWP1 qui pourrait jouer un rôle important lors des processus cancéreux.

**Article 2 : WWP1 and STARD13 function in partnership to target active RhoA for degradation.**

Courivaud T, Awina H, Levy L, Ferrigno O, Atfi A and Prunier C.

*En préparation.*

**The ubiquitin ligase WWP1 function in partnership with the Rho GAP STARD13 to regulate cytoskeleton remodeling by targeting active RhoA for degradation**

Thomas Courivaud<sup>1,2</sup>, Hala Awina<sup>1,2</sup>, Laurence Levy<sup>1,2</sup>, Olivier Ferrigno<sup>1,2</sup>, Azeddine Atfi<sup>1,2,3</sup> and Céline Prunier<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>From Université Pierre et Marie Curie, Université Paris 6,

<sup>2</sup>INSERM UMRS 938, Laboratory of Cell Signaling and Carcinogenesis, Hôpital Saint-Antoine, 34 rue Crozatier, 75012 Paris, France

<sup>3</sup>Cancer Institute, University of Mississippi Medical Center, 2500 North State Street, Jackson, Mississippi 39216-6806, USA

\*Requests for reprints: Céline Prunier; Phone: (33,1) 49 28 66 90; E-mail: celine.prunier@inserm.fr

Running Title: WWP1-STARD13 complex induces RhoA degradation

Keywords: Cancer pathogenesis, Cell migration, Cytoskeleton remodeling, E3 ubiquitin ligase, RhoA, STARD13, WWP1/Tiul1,

## ABSTRACT

The *WWP1* gene (also known as *Tiul1*) encodes a Hect E3 ubiquitin ligase that is deregulated in many human malignancies, including breast cancer. However, whether alterations in WWP1 activity contribute to cancer pathogenesis or progression remains poorly understood. Here, we report a physiological function of WWP1 in cytoskeleton remodeling and cell migration. Using the yeast two-hybrid system, we identified the RhoGAP, STARD13, as a WWP1 interacting partner that mediates association of WWP1 with RhoA, thereby leading to RhoA polyubiquitination and degradation. Intriguingly, the STARD13/WWP1 complex preferentially targets the active form of RhoA for degradation, suggesting that this complex might function to restrain cell migration and invasion. Corroborating this view, depletion of WWP1 in breast cancer cells resulted in increased abundance of activated RhoA and attendant cytoskeleton remodeling and cell migration. These results reveal a previously unrecognized role for WWP1 in controlling RhoA abundance and activity, thus providing new insights into the molecular mechanisms that govern cancer cell migration during cancer progression.

## INTRODUCTION

WWP1 belongs to the Nedd4 subfamily of the Hect E3 ubiquitin ligases. Structurally, WWP1 is composed of a N-terminal lipid binding C2 domain, 4 protein-interacting WW domains and a catalytic Hect (Homology to E6 Carboxyl Terminus) domain (1). WWP1 activity is silenced under basal conditions by an auto-inhibitory mechanism involving an intra-interaction between Hect and WW or C2 domain. Upon substrate binding, the interaction between Hect and the C2 or WW domains is disabled, leading to increased polyubiquitination activity that affects the stability of WWP1 itself and that of its substrates as well (2).

Accumulating evidence suggests that deregulation of WWP1 activity contributes to the pathogenesis of human cancers (1). For instance, WWP1 is located at 8q21, a chromosomal region that is frequently amplified in breast and prostate cancers. In addition, overexpression of WWP1 has been noted in breast and prostate cancer tumors (3-6). Of particular importance, enforced expression of WWP1 promotes breast and prostate cell proliferation, whereas its depletion exerts the opposite effects, further emphasizing WWP1 as an oncogenic protein in these malignancies (3-5,7,8). However, this view has been confronted by several recent studies suggesting that WWP1 also functions as a tumor suppressor at late stages of carcinogenesis. For instance, low expression of WWP1 in human breast cancers is associated with poor prognosis, and depletion of WWP1 in breast cancer cells has been shown to foster their metastasis (6,9). Since many WWP1 substrates (i.e., p63, EGFR, HER4, LATS1, Runx2, CXCR4, TRAF6 or KLF2 and KLF5) have either tumor-promoting or tumor-suppressive roles, it is conceivable that WWP1 might fulfill distinct roles during tumor initiation, progression, or both (1,8-17). Congruent with this notion, studies from our own and other laboratories have shown that WWP1 functions as a negative regulator of the TGF $\beta$  signaling pathway, which is known to elicit both tumor suppressor and tumor promoter effects. WWP1 inhibits TGF $\beta$  signaling by inducing degradation of several components of this pathway, including the activated TGF $\beta$  type I receptor (T $\beta$ RI) in conjunction with Smad7, and Smad2 in conjunction with the homeodomain protein TGIF (18-20). In light of these studies, it is tempting to speculate that WWP1 might play a dual role during cancer progression, as does TGF $\beta$  signaling. Identifying new substrates of WWP1 is therefore a subject of major interest.

STARD13 (StAR-related lipid transfer Domain containing 13), also known as deleted in liver cancer 2 protein (DLC2), has been discovered through screening for candidate tumor



suppressor genes within the chromosomal locus 13q12, which is frequently deleted in cancer (21,22). The STARD13 protein contains a N-terminal SAM (Sterile Alpha Motif) motif for protein-protein interaction, a C-terminal START (STAR-related lipid Transfer) motif for lipid binding, and a GTPase-activating protein (GAP) domain. STARD13 negatively regulates the small GTPases RhoA and Cdc42 by stimulating their intrinsic GTPase activity, thereby culminating in formation of their inactive GDP-bound form (22,23). Cancer gene profiling studies revealed that STARD13 expression is down-regulated in several cancer cell types, raising the possibility that STARD13 might function as a tumor suppressor gene (22,24). Consistent with its function as a RhoA antagonist, ectopic expression of STARD13 compromises several aspects of tumorigenesis, including cell growth, cytoskeleton remodeling, and migration (21,23,25-27). Recently, it has been reported that STARD13 can also restrain tumor growth by ensuring mitotic fidelity, presumably owing to its ability to regulate Cdc42 activity (28).

RhoA is well known for its role in cell migration and invasion, in particular through its effects on actin cytoskeleton. RhoA knockdown induces an elongated cell shape, whereas sustained activation of RhoA caused a rounded cell shape with membrane blebbing, a process that drives amoeboid-like motility during invasion (29). Hahn and collaborators have shown that RhoA orchestrates random migration, with activated RhoA localizes to both leading and rearing edge of migrating cells (30,31), further documenting the critical role of active RhoA in cell migration and invasion. From a clinical perspective, elevated levels of RhoA strongly correlates with cancer progression and metastatic aggressiveness (32). At present, the molecular mechanisms behind the deregulated expression and/or activity of RhoA in human cancers remain poorly understood.

In our effort to further delineate the role of WWP1 in carcinogenesis, we identified STARD13 as a WWP1 interacting partner. Subsequent functional experiments demonstrated a requirement of STARD13 for WWP1-induced RhoA ubiquitination and degradation. STARD13/WWP1 complex targets specifically the activated form of RhoA for degradation, thereby restraining cell migration. As such, our finding that WWP1 regulates cell migration by targeting active RhoA for degradation open up new opportunities to the Rho GTPases field, both in terms of understanding the underlying mechanisms, and in terms of drug discovery to restrain cell migration and metastasis.

## RESULTS

### WWP1 interacts with STARD13

To gain further insight into the mechanism of action of WWP1, we performed a yeast two-hybrid interaction screen using full-length WWP1 as bait and a human placental cDNA library as prey. Beyond known interactors of WWP1, such as Smad7 or ARDC1, our screen also identified STARD13 (also known as DLC2) that binds to WWP1 with a high Predicted Biological Score (PBS: B). To confirm this interaction in mammalian cells, we expressed Myc-STARD13 with Flag-WWP1 in HEK293 cells. Immunoprecipitation of cell lysates with anti-Flag antibody revealed the presence of Myc-STARD13, which was absent in a control transfection in which only Myc-STARD13 was transfected (Figure 1A). In a reciprocal fashion, the association between WWP1 and STARD13 was also observed when cell lysates are subjected to immunoprecipitation with anti-Myc antibody directed toward STARD13 followed by immunoblotting with anti-Flag antibody for the presence of WWP1 (Figure 1A). To dissect this interaction further, we conducted coimmunoprecipitation to map the domains in WWP1 and STARD13 that mediate their interaction. We found that the last 200 amino acids of STARD13, which encompass the START domain, were sufficient for interaction with WWP1 (Figure 1B). A similar analysis using several WWP1 deletion constructs revealed that STARD13 specifically binds to the C2 domain of WWP1 (Figure 1C).

To ascertain the physiological relevance of this interaction, we examined the interaction between endogenous WWP1 and STARD13. The screen of various cell lines prompted us to choose the human breast cancer cell line MCF7, which expresses detectable levels of both WWP1 and STARD13. STARD13 was therefore immunoprecipitated from MCF7 extracts with an anti-STARD13 antibody, and the associated WWP1 was visualized by immunoblotting using anti-WWP1 antibody. As anticipated from transient transfection experiments, we detected a robust interaction between WWP1 and STARD13. Of note, the endogenous interaction of WWP1 with STARD13 was not detected in cells depleted for STARD13 by siRNA (Figure 1D), attesting to the specificity of this interaction. Immunofluorescence experiments showed that WWP1 and STARD13 were extensively colocalized in the cytoplasm, providing further support to their physical interaction (Figure 1E).

### **WWP1 interacts with STARD13 to induce RhoA degradation**

Because WWP1 functions as an E3 ubiquitin ligase, we sought to determine whether it could catalyze STARD13 ubiquitination (Figure 2A). In several attempts, we have not been able to detect any ubiquitination of STARD13 in the presence or absence of WWP1. Under the same experimental conditions, we could clearly detect ubiquitination of the activated T $\beta$ RI at steady states, which was further increased by expressing WWP1. In an alternative experimental approach, overexpressing or depleting WWP1 did not affect STARD13 steady state levels (Figures 2B, C), further arguing against the possibility that WWP1 might trigger STARD13 ubiquitination and degradation.

Previous studies have reported that WWP1 acts on its substrates via interaction with an adaptor protein, as exemplified by the degradation of T $\beta$ RI in association with Smad7 (18,19). Mechanistically, Smad7 associates with and relieves WWP1 auto-inhibition, leading to increased auto-polyubiquitination and polyubiquitination of T $\beta$ RI. Interestingly, depletion of STARD13 in breast cancer MCF-7 or MDA-MB-231 cell lines led to an increase in the WWP1 expression levels (Figure 2D), suggesting that STARD13 may stimulate WWP1 catalytic activity by acting as an adaptor for WWP1, as does Smad7. Consistent with this finding, ectopic expression of STARD13 increased WWP1 polyubiquitination (Figure 2E).

Since STARD13 functions as a RhoGAP, we hypothesized that WWP1 may act in partnership with STARD13 to catalyze RhoA polyubiquitination. To test this possibility, we first looked for a possible interaction between WWP1 and RhoA. As shown in Figure 3A, RhoA displays strong affinity for wild-type WWP1. This interaction appeared to occur in a manner independent of WWP1 catalytic activity, since Rho exhibited similar affinity for the catalytic inactive mutant WWP1.C890A and the wild-type counterpart. Immunoprecipitation experiments using specific antibodies confirmed the endogenous association between WWP1 and RhoA in MCF-7 cells (Figure 3B). We next examined whether WWP1 could induce RhoA polyubiquitination and degradation. As shown in Figure 3C, expression of WWP1 alone resulted in a slight but significant decrease in RhoA protein expression. Strikingly, coexpression of STARD13 with WWP1 elicited a marked decrease in the RhoA expression levels. In contrast to wild-type WWP1, co-expressing the catalytically inactive mutant WWP1.C890A had no effect on RhoA expression (Figure 3D), reinforcing the hypothesis that WWP1 functions as a RhoA ubiquitin ligase. We independently confirmed this finding by demonstrating that coexpression of STARD13 can enhance WWP1's ability to accelerate the RhoA turnover (Figure 3E). This effect seems to be specific for RhoA, since WWP1 was not

able to induce degradation of two other GTPases of the Rho family, Cdc42 and Rac1 (Figure 3F).

Several lines of evidence indicate that WWP1 functions in partnership with STARD13 to induce polyubiquitination and degradation of RhoA. First, an *in vivo* ubiquitination assay revealed that RhoA is moderately polyubiquitinated in the presence of wild-type WWP1 (Figure 4A). Second, expression of WWP1.C890A failed to induce RhoA ubiquitination (Figure 4A). Third, coexpression of STARD13 along with WWP1 provoked a striking increase in ubiquitin-conjugated RhoA protein (Figure 4B). Finally, depletion of endogenous STARD13 blocked WWP1-induced polyubiquitination and decreased expression of RhoA (Figure 4C, D), providing further support to the notion that WWP1 acts in partnership with STARD13 to drive RhoA degradation.

### **WWP1 and STARD13 target the activated RhoA**

We next investigated the possibility that the WWP1/STARD13 complex might target a specific state of RhoA, namely activated (GTP-bound) or inactivated (GDP-bound) form of RhoA. To probe this possibility, we made use of a cell permeable activator of Rho (Rho activator II) (33,34). In transient transfection experiment, treatment of cells with the RhoA activator stabilized the RhoA/WWP1 complex (Figure 5A). Noteworthy, the association between endogenous RhoA and WWP1 was also increased in the presence of the RhoA activator (Figure 5B), providing further support that WWP1 may preferentially induce degradation of the activated RhoA. Corroborating this hypothesis, expression of WWP1 and STARD13 was more potent at degrading the active RhoA as compared to the inactive form of RhoA (Figure 5C). In an alternative experimental approach, expression of STARD13 also enhanced WWP1-induced polyubiquitination of the activated form of RhoA but had no effect on the inactivated form (Figure 5D). More crucially, depletion of either STARD13 or WWP1 in MCF-7 and MDA-MB-231 cells resulted in increased accumulation of the endogenous active form of RhoA (Figure 5E), attesting to the ability of STARD13 and WWP1 to induce degradation of the endogenous active form of RhoA. Immunofluorescence experiments confirmed that cells expressing WWP1 displayed a weak staining for the activated form of RhoA, as compare to the non-expressing neighboring cells (Figure 5F). Collectively, these results provide strong evidence that WWP1 function in conjunction with STARD13 to trigger ubiquitination and degradation of active RhoA.

### **WWP1/STARD13 complex affects migration of breast cancer cells**

Given that activation of RhoA is a key step in actin cytoskeleton re-organization, we sought to investigate whether WWP1 could affect such process. Indeed, silencing WWP1 in MCF-7 cells had a dramatic effect on cell architecture. As compared to control cells, which display a more diffuse pattern of F-actin, WWP1-depleted cells displayed an extensive rearrangement of the actin cytoskeleton, as evidenced by the retraction of membrane protrusion and increased cortical F-actin staining. F-actin staining also revealed the presence of membrane blebbing, which is a characteristic of cells with high Rho activity (Figure 6A).

Reorganization of the actin cytoskeleton through activation of RhoA provides the dynamic forces for cell migration under physiological and physiopathological conditions, such as cancer cell invasion and metastasis. Given its implication in cancer, WWP1 could conceivably affect migration of breast cancer cells by associating with STARD13 and inducing degradation of active RhoA. To probe this possibility, we conducted wound-healing experiments, and observed that depleting STARD13 was able to increase MCF-7 cell migration, similar to previous observations (23,26,27) (Figure 6B). Likewise, depleting WWP1 significantly enhanced MCF-7 cell migration, and this effect was rescued upon treatment of cells with a RhoA inhibitor (Figure 6C). Similar results were obtained with MDA-MB-231, providing further evidence that WWP1 and STARD13 play an important role in breast cancer cell migration (Figure 6D). Altogether, these observations suggest that the WWP1/STARD13 complex controls cell migration, most likely by targeting the active RhoA for degradation.

## DISCUSSION

The work reported here revealed a new role for the E3 ubiquitin ligase WWP1 in controlling RhoA stability, which is executed in partnership with the RhoGAP STARD13. STARD13 acts not only as an activator of WWP1, but also as an adaptor that mediates the association between WWP1 and RhoA, leading to polyubiquitination and degradation of RhoA in its activated state. In so doing, the WWP1/STARD13 complex regulates cytoskeleton remodeling and cell migration of breast cancer cells. Collectively, these findings highlight a potential role for WWP1 in cell migration during cancer metastasis.

The Rho GTPases cycle between an active GTP-bound form and an inactive GDP-bound form by hydrolyzing GTP to GDP. Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) facilitate nucleotide exchange by promoting release of GDP from Rho, thus allowing GTP binding. Once activated, Rho GTPases interact with downstream protein effectors, including phospholipases, kinases, and actin regulators. Rho GTPases have low intrinsic GTPase activity, which can be stimulated by GTPase-activating proteins (GAP). GAP and GEF proteins are therefore responsible for the modulation of Rho GTPases activity by promoting the conversion of the active protein to the inactive protein and vice-versa. The activity of most Rho GTPases can also be regulated by other posttranslational modifications. For example, the addition of lipid at the C-terminal end of Rho GTPases allows them to locate to the membrane, where they interact with GEF and GAP proteins as well as their downstream effectors. Besides lipid modifications, it has been shown that PKA, PKG, and AMPK  $\alpha$ -1 kinases can phosphorylate RhoA and thereby inhibit its activity through sequestration into the cytosol (35-38). Ubiquitination-dependent degradation of Rho GTPases has also been shown to modulate their activity. Degradation of Rho GTPases was first studied during host-pathogen interactions (39). So far, three E3 ubiquitin ligases have been suggested to induce RhoA ubiquitination and degradation, including SCF<sup>FBX19</sup>, Cullin-3/BACURD, and Smurf1. The SCF<sup>FBX19</sup> and Smurf1 target both the active and inactive form of RhoA (40-43), whereas the Cullin-3/BACURD ubiquitin ligase complex targets only the inactive RhoA (44). Because the activity of the Rho GTPases needs to be spatially and temporally controlled, it seems reasonable that several E3 ubiquitin ligases would be necessary to fine-tune the degradation rate of RhoA to produce specific and restricted functions. Along these lines, our study provides new perspective on the regulation of Rho GTPases, since we demonstrate that WWP1/STARD13 preferentially induces degradation of the active RhoA, which directly

impinges on the reorganized cytoskeleton architectures that facilitate cell migration and invasion.

Although WWP1 has been shown to influence cell proliferative and migratory behaviors in many types of malignancies, the underlying molecular mechanisms remain largely obscure. Likewise, the activity of RhoA is also often deregulated in human cancers, but the underlying mechanisms are not well understood. Thus, by demonstrating that WWP1 preferentially induces degradation of the activated form of RhoA, our study provide the first evidence that WWP1 plays a crucial role in cytoskeleton rearrangement, which is an initial step of an elaborated circuitry that governs cell extravasion, invasion, and colonization of distant organs. Because WWP1 has been described as an oncogenic protein, our study also highlights the tantalizing possibility that WWP1 might function as a tumor suppressor gene at advanced stages of cancer progression by eliciting an anti-migratory function that restrains invasion and metastasis.

Quite intriguingly, our results identify the RhoGAP STARD13 as a WWP1 interacting partner that is required for WWP1-mediated RhoA ubiquitination and degradation. Specifically, we found that STARD13 functions as a bridging factor between WWP1 and active RhoA, thus enabling WWP1 to induce ubiquitination and clearance of active RhoA. Of relevance, STARD13 has been shown to inactivate RhoA exclusively through its GAP activity. One study has nevertheless reported that STARD13 protein expression is negatively correlated with RhoA protein expression in hepatocellular carcinoma without providing any potential mechanism (45). Thus, by demonstrating that STARD13 can also inactivate RhoA by orchestrating its degradation by WWP1, our study describes an unprecedented cooperative mechanism that controls cytoskeleton reorganization, a prominent step of cell invasion and metastasis. We suggest that this cooperative mechanism might function to fine-tune the availability of active RhoA to an extent that is suitable for maintaining normal cell function and tissue homeostasis under physiological conditions. Alternatively, STARD13 and WWP1 could function in synergy to accelerate degradation of deregulated (i.e., hyperactive) RhoA in cancer cells, which could conceivably constitute a tumor suppressive barrier that impedes cell migration and metastasis. Finally, it is also conceivable that STARD13 might function to inactivate RhoA only by either converting it active GTP-bound form to its GDP-bound form or inducing its degradation by WWP1, depending on the pathophysiological setting or the expression levels of active Rho within cells. Therefore, the molecular framework that we propose will likely contribute to the elucidation of mechanistic paradigms of cell migration and metastasis during the course of cancer progression.

Since STARD13 has been shown to possess a GAP activity for the GTPases RhoA and Cdc42, it appears surprisingly that WWP1 induces specifically the degradation of RhoA, but not Cdc42. Although STARD13 has been first described to possess a GAP activity towards both RhoA and Cdc42 *in vitro*, STARD13's GAP activity was mainly described for RhoA *in vivo* in the majority of investigations (23,27,45,46). In light of these and our own findings, it is tempting to suggest that WWP1 might associate selectively with the pool of STARD13 that is dedicated to the inactivation and degradation of RhoA. Future studies will be necessary to delineate why WWP1/STARD13 specifically triggers degradation of RhoA.

STARD13 is considered as a potential tumor suppressor based on its recurrent deletion in human malignancies, including breast cancers. Functionally, STARD13 has been shown to restrain migration and metastasis by inactivating RhoA. Thus, by identifying STARD13 as a WWP1 activator and critical adaptor that facilitates WWP1-induced ubiquitination and degradation of activated RhoA, our study highlights an unprecedented described function of STARD13 that could contribute to its tumor suppressor role during cancer progression. More importantly, since WWP1 seems to function in the STARD13 tumor suppressor network to impede cell migration, our study also emphasizes WWP1 as an anti-metastatic protein, which will likely lead to a paradigm shift in our understanding of the vast plethora of molecular mechanisms that govern cancer progression and metastasis.



## MATERIALS and METHODS

### *Two-two Hybrid Screen*

The yeast-two hybrid screen was performed by *Hybrigenics*, S.A., Paris. cDNA encoding full-length human WWP1 was cloned into pB27 as a C-terminal fusion to LexA (N-LexA-WWP1-C fusion). The resulting plasmid was used as bait in yeast two-hybrid screens of a placental cDNA library. The Predicted Biological Score (PBS) indicates confidence of interaction (A is highest) and is consultable at the following website <https://pimr.hybrigenics.com/static/pimrider/PBS.pdf>.

### *Plasmids, Antibodies and Reagents*

The following plasmids were previously described: Flag-WWP1, Flag-WWP1.C890A, His-Ub, HA-T $\beta$ RI.act, and Myc-Smad7 (18). Expression vector for Myc-STARD13 and MycSTARD13 (312-113) were generous gifts from Dr. Judy Yam (47). HA-RhoA and HA.RhoA.act (RhoA-Val14) were generous gifts from Dr. Shinya Kuroda and Dr. Carol Williams (48). HA-RhoA.DN (RhoA-Asn19) and Myc-Rac1 were generous gifts from Dr. Carol Williams and Dr. Christian Gerspach (49). Myc-Cdc42 was purchased from Addgene (ID 12972/ Dr Gary Bokoch's lab). pGIPZ, pGIPZ-Sh1WWP1 (V2LHS\_262674), pGIPZ-Sh2WWP1 (V2LHS\_5907), and pGIPZ-ShSTARD13 (V3LHS\_360530) were purchased from GE Dharmacon. Myc-STARD13 (332-908) and Myc-STARD13 (909-113) were generated by PCR using Myc-STARD13 as template and subcloned at SnaB1/EcoRI into pCS2+MT.

The following siRNA from GE Dharmacon were used: siWWP1(1) (J-004251-07), siWWP1(2) (J-004251-08), siWWP1(3) (J-004251-09), siSTARD13(1) (J-010256-06), siSTARD13(2) (J-010256-07), and siSTARD13(3) (J-010256-08).

Rho Activator II (CN-03) and Rho Inhibitor (CT-04) were purchased from Tebu-bio and were used at a final concentration of 1  $\mu$ g/ml.

The following antibodies were used for immunoblotting or immunoprecipitation: anti-Flag M2 (Sigma), anti-HA (Roche), anti-Myc (Roche), anti-WWP1 (Abnova), anti-GFP (Abcam), anti-STARD13 (Abcam), anti-RhoA (26C4; Santa Cruz), and anti-GAPDH (Santa Cruz).

### ***Cell culture, Transfection, and Generation of stable cell lines***

HEK293, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics (penicillin and streptomycin).

Cells were cotransfected with pGFP vector for normalization of transfection efficiency. Lipofectamine reagent (Invitrogen) and DharmaFECT (GE Dharmacon) were used to transfect plasmids and siRNA respectively, according to the manufacturer's protocols.

Stable transfected cell lines were generated by transfection of MDA-MB-231 cells with pGIPZ-Sh1WWP1 (MDA-MB-231-Sh1WWP1 cells), pGIPZ-Sh2WWP1 (MDA-MB-231-Sh2WWP1 cells), pGIPZ-ShSTARD13 (MDA-MB-231-ShSTARD13 cells) or pGIPZ (control vector) (MDA-MB-231-ShCont cells) (GE Dharmacon). Cells were selected in medium containing 3µg/ml puromycin and maintained as a single population.

### ***Immunoprecipitation and Western Blotting***

Cells were lysed at 4°C in lysis buffer TNMG (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 0.5% NP-40, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and EDTA-free protease inhibitor cocktail Complete from Roche Diagnostic) followed by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min at 4°C. For western blotting, cell lysates were fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. GFP fluorescence was then measured to normalize cell extracts.

For immunoprecipitation, 1 mg of cell lysates were precleared using Sepharose-protein G for 1 hr and then centrifuged at 6,000 rpm for 10 min at 4°C. Lysates were subjected to immunoprecipitation with the appropriate antibody for 2 hr, followed by adsorption to Sepharose-protein G for 1 hr and washing by centrifugation using TNMG buffer.

### ***RhoA activity assay***

Fresh cells were washed with ice-cold PBS and lysed in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 0.5% NP-40, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and EDTA-free protease inhibitor cocktail Complete from Roche Diagnostic) followed by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min at 4°C. 2 mg of cell lysates were incubated with GST-Rhotekin-RBD (50 µg) for 1 hour at 4°C. Affinity complexes were washed three times with washing buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 0.5% NP-40). Bound proteins were eluted by incubation with Laemmli buffer at 95°C for 5 min. The eluted samples were analyzed by western blot using RhoA antibody (Santa Cruz, 26C4).

### ***Ubiquitination***

In all ubiquitination experiments, cells were incubated with MG-132 (10  $\mu$ M) for 4 hr before lysis. For His-Ub pull-down, cells were lysed at 4°C in ubiquitination buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM NaF, 2mM EGTA, 1mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 % Nonidet P-40, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 5mM DTT, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and EDTA-free protease inhibitor mixture (Complete from Roche Diagnostic) followed by sonication. Cell lysates were precleared using Sepharose-protein G for 1 hr and then centrifuged at 6,000 rpm for 10 min at 4°C. Cell lysates were then incubated with nickel-NTA-agarose (Invitrogen) for 2 hr and the beads were washed three times with ubiquitination buffer. Ubiquitinated proteins were then separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies.

### ***Immunofluorescence***

Cells plated on glass coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde-PBS for 30 min and permeabilized in 0.3% Triton X-100 at room temperature for 1 hr. They were incubated overnight at 4°C with Alexa Fluor® 594 phalloidin (Life Technologies) or with the indicated combinations of anti-Flag, anti-HA and anti-STARD13 antibodies. Then cells were incubated with the secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor® 594 or Alexa Fluor® 488 and Dapi and examined on a fluorescence microscope.

### ***Wound healing Assay***

Wound healing assay was carried out using silicon culture inserts (Ibidi). Briefly, cells were seeded in wound assay chambers and grown to confluence. The silicon insert was removed and the wound was photographed at multiple sites at 0 and 20 hr after wounding using an inverted microscope with a 10X objective. Data represent the average (%) of wound closure.

### ***Statistical Analysis***

The results are presented as means  $\pm$  and standard deviation (SD) of three independent experiments. Student's *t*-test analysis was used to determine the difference between the results of experimental group with those of control. The results were considered statistically significant with \* *p*-value < 0.05, \*\**p*-value <0.01, \*\*\**p*-value <0.001.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Drs. Judy Yam, Shinya Kuroda, Carol Williams and Christian Gespach for providing plasmids.

This work was funded by a grant from “Association pour la Recherche Contre le Cancer (ARC)”. Thomas Courivaud was supported by a doctoral fellowship from “La Ligue Nationale Contre le Cancer” and “Association pour la Recherche Contre le Cancer (ARC)”.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Zhi, X., and Chen, C. (2012) WWP1: a versatile ubiquitin E3 ligase in signaling and diseases. *Cell Mol Life Sci* **69**, 1425-1434
2. Courivaud, T., Ferrand, N., Elkhattouti, A., Kumar, S., Levy, L., Ferrigno, O., Atfi, A., and Prunier, C. (2015) Functional Characterization of a WWP1/Tiul1 Tumor-derived Mutant Reveals a Paradigm of Its Constitutive Activation in Human Cancer. *J Biol Chem* **290**, 21007-21018
3. Chen, C., Sun, X., Guo, P., Dong, X. Y., Sethi, P., Zhou, W., Zhou, Z., Petros, J., Frierson, H. F., Jr., Vessella, R. L., Atfi, A., and Dong, J. T. (2007) Ubiquitin E3 ligase WWP1 as an oncogenic factor in human prostate cancer. *Oncogene* **26**, 2386-2394
4. Chen, C., Zhou, Z., Ross, J. S., Zhou, W., and Dong, J. T. (2007) The amplified WWP1 gene is a potential molecular target in breast cancer. *Int J Cancer* **121**, 80-87
5. Chen, C., Zhou, Z., Sheehan, C. E., Slodkowska, E., Sheehan, C. B., Boguniewicz, A., and Ross, J. S. (2009) Overexpression of WWP1 is associated with the estrogen receptor and insulin-like growth factor receptor 1 in breast carcinoma. *Int J Cancer* **124**, 2829-2836
6. Nguyen Huu, N. S., Ryder, W. D., Zeps, N., Flasz, M., Chiu, M., Hanby, A. M., Poulson, R., Clarke, R. B., and Baron, M. (2008) Tumour-promoting activity of altered WWP1 expression in breast cancer and its utility as a prognostic indicator. *J Pathol* **216**, 93-102
7. Zhou, Z., Liu, R., and Chen, C. (2012) The WWP1 ubiquitin E3 ligase increases TRAIL resistance in breast cancer. *Int J Cancer* **130**, 1504-1510
8. Li, Y., Zhou, Z., and Chen, C. (2008) WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1 targets p63 transcription factor for ubiquitin-mediated proteasomal degradation and regulates apoptosis. *Cell death and differentiation* **15**, 1941-1951
9. Subik, K., Shu, L., Wu, C., Liang, Q., Hicks, D., Boyce, B., Schiffhauer, L., Chen, D., Chen, C., Tang, P., and Xing, L. (2012) The ubiquitin E3 ligase WWP1 decreases CXCL12-mediated MDA231 breast cancer cell migration and bone metastasis. *Bone* **50**, 813-823
10. Yeung, B., Ho, K. C., and Yang, X. (2013) WWP1 E3 ligase targets LATS1 for ubiquitin-mediated degradation in breast cancer cells. *PloS one* **8**, e61027
11. Chen, C., Zhou, Z., Liu, R., Li, Y., Azmi, P. B., and Seth, A. K. (2008) The WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 upregulates ErbB2 and EGFR through RING finger protein 11. *Oncogene* **27**, 6845-6855
12. Feng, S. M., Muraoka-Cook, R. S., Hunter, D., Sandahl, M. A., Caskey, L. S., Miyazawa, K., Atfi, A., and Earp, H. S., 3rd. (2009) The E3 ubiquitin ligase WWP1 selectively targets HER4 and its proteolytically derived signaling isoforms for degradation. *Mol Cell Biol* **29**, 892-906
13. Chen, C., Sun, X., Guo, P., Dong, X. Y., Sethi, P., Cheng, X., Zhou, J., Ling, J., Simons, J. W., Lingrel, J. B., and Dong, J. T. (2005) Human Kruppel-like factor 5 is a target of the E3 ubiquitin ligase WWP1 for proteolysis in epithelial cells. *J Biol Chem* **280**, 41553-41561
14. Zhang, X., Srinivasan, S. V., and Lingrel, J. B. (2004) WWP1-dependent ubiquitination and degradation of the lung Kruppel-like factor, KLF2. *Biochemical and biophysical research communications* **316**, 139-148

15. Jones, D. C., Wein, M. N., Oukka, M., Hofstaetter, J. G., Glimcher, M. J., and Glimcher, L. H. (2006) Regulation of adult bone mass by the zinc finger adapter protein Schnurri-3. *Science* **312**, 1223-1227
16. Peschiaroli, A., Scialpi, F., Bernassola, F., El Sherbini el, S., and Melino, G. (2010) The E3 ubiquitin ligase WWP1 regulates DeltaNp63-dependent transcription through Lys63 linkages. *Biochemical and biophysical research communications* **402**, 425-430
17. Lin, X. W., Xu, W. C., Luo, J. G., Guo, X. J., Sun, T., Zhao, X. L., and Fu, Z. J. (2013) WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 (WWP1) negatively regulates TLR4-mediated TNF-alpha and IL-6 production by proteasomal degradation of TNF receptor associated factor 6 (TRAF6). *PloS one* **8**, e67633
18. Seo, S. R., Lallemand, F., Ferrand, N., Pessah, M., L'Hoste, S., Camonis, J., and Atfi, A. (2004) The novel E3 ubiquitin ligase Tiul1 associates with TGIF to target Smad2 for degradation. *The EMBO journal* **23**, 3780-3792
19. Komuro, A., Imamura, T., Saitoh, M., Yoshida, Y., Yamori, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2004) Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene* **23**, 6914-6923
20. Moren, A., Imamura, T., Miyazono, K., Heldin, C. H., and Moustakas, A. (2005) Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT domain ubiquitin ligases. *J Biol Chem* **280**, 22115-22123
21. Nagaraja, G. M., and Kandpal, R. P. (2004) Chromosome 13q12 encoded Rho GTPase activating protein suppresses growth of breast carcinoma cells, and yeast two-hybrid screen shows its interaction with several proteins. *Biochemical and biophysical research communications* **313**, 654-665
22. Ching, Y. P., Wong, C. M., Chan, S. F., Leung, T. H., Ng, D. C., Jin, D. Y., and Ng, I. O. (2003) Deleted in liver cancer (DLC) 2 encodes a RhoGAP protein with growth suppressor function and is underexpressed in hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* **278**, 10824-10830
23. Leung, T. H., Ching, Y. P., Yam, J. W., Wong, C. M., Yau, T. O., Jin, D. Y., and Ng, I. O. (2005) Deleted in liver cancer 2 (DLC2) suppresses cell transformation by means of inhibition of RhoA activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 15207-15212
24. Ullmannova, V., and Popescu, N. C. (2006) Expression profile of the tumor suppressor genes DLC-1 and DLC-2 in solid tumors. *International journal of oncology* **29**, 1127-1132
25. Nasrallah, A., Saykali, B., Al Dimassi, S., Khoury, N., Hanna, S., and El-Sibai, M. (2014) Effect of StarD13 on colorectal cancer proliferation, motility and invasion. *Oncology reports* **31**, 505-515
26. Lin, Y., Chen, N. T., Shih, Y. P., Liao, Y. C., Xue, L., and Lo, S. H. (2010) DLC2 modulates angiogenic responses in vascular endothelial cells by regulating cell attachment and migration. *Oncogene* **29**, 3010-3016
27. Tang, F., Zhang, R., He, Y., Zou, M., Guo, L., and Xi, T. (2012) MicroRNA-125b induces metastasis by targeting STARD13 in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. *PloS one* **7**, e35435
28. Vitiello, E., Ferreira, J. G., Maiato, H., Balda, M. S., and Matter, K. (2014) The tumour suppressor DLC2 ensures mitotic fidelity by coordinating spindle positioning and cell-cell adhesion. *Nature communications* **5**, 5826

29. Ridley, A. J. (2013) RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. *Journal of microscopy* **251**, 242-249
30. Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R. L., and Hahn, K. M. (2006) Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* **440**, 1069-1072
31. O'Connor, K., and Chen, M. (2013) Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases* **4**, 141-147
32. Gomez del Pulgar, T., Benitah, S. A., Valeron, P. F., Espina, C., and Lacal, J. C. (2005) Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **27**, 602-613
33. Flatau, G., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, P., Paris, S., Fiorentini, C., and Boquet, P. (1997) Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* **387**, 729-733
34. Schmidt, G., Sehr, P., Wilm, M., Selzer, J., Mann, M., and Aktories, K. (1997) Gln 63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* **387**, 725-729
35. Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S. M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P., and Loirand, G. (2000) Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* **275**, 21722-21729
36. Sawada, N., Itoh, H., Yamashita, J., Doi, K., Inoue, M., Masatsugu, K., Fukunaga, Y., Sakaguchi, S., Sone, M., Yamahara, K., Yurugi, T., and Nakao, K. (2001) cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. *Biochemical and biophysical research communications* **280**, 798-805
37. Gayard, M., Guilluy, C., Rousselle, A., Viollet, B., Henrion, D., Pacaud, P., Loirand, G., and Rolli-Derkinderen, M. (2011) AMPK alpha 1-induced RhoA phosphorylation mediates vasoprotective effect of estradiol. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **31**, 2634-2642
38. Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M., and Bertoglio, J. (1996) Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *The EMBO journal* **15**, 510-519
39. Doye, A., Mettouchi, A., Bossis, G., Clement, R., Buisson-Touati, C., Flatau, G., Gagnoux, L., Piechaczyk, M., Boquet, P., and Lemichez, E. (2002) CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* **111**, 553-564
40. Wei, J., Mialki, R. K., Dong, S., Khoo, A., Mallampalli, R. K., Zhao, Y., and Zhao, J. (2013) A new mechanism of RhoA ubiquitination and degradation: roles of SCF(FBXL19) E3 ligase and Erk2. *Biochimica et biophysica acta* **1833**, 2757-2764
41. Wang, H. R., Zhang, Y., Ozdamar, B., Ogunjimi, A. A., Alexandrova, E., Thomsen, G. H., and Wrana, J. L. (2003) Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* **302**, 1775-1779
42. Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Faul, C., Tomino, Y., Kim, K., and Mundel, P. (2006) Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nature cell biology* **8**, 485-491
43. Boyer, L., Turchi, L., Desnues, B., Doye, A., Ponzio, G., Mege, J. L., Yamashita, M., Zhang, Y. E., Bertoglio, J., Flatau, G., Boquet, P., and Lemichez, E. (2006) CNF1-induced ubiquitylation and proteasome destruction of activated RhoA is impaired in Smurf1<sup>-/-</sup> cells. *Molecular biology of the cell* **17**, 2489-2497



44. Chen, Y., Yang, Z., Meng, M., Zhao, Y., Dong, N., Yan, H., Liu, L., Ding, M., Peng, H. B., and Shao, F. (2009) Cullin mediates degradation of RhoA through evolutionarily conserved BTB adaptors to control actin cytoskeleton structure and cell movement. *Molecular cell* **35**, 841-855
45. Xiaorong, L., Wei, W., Liyuan, Q., and Kaiyan, Y. (2008) Underexpression of deleted in liver cancer 2 (DLC2) is associated with overexpression of RhoA and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *BMC cancer* **8**, 205
46. Chan, F. K., Chung, S. S., Ng, I. O., and Chung, S. K. (2012) The RhoA GTPase-activating protein DLC2 modulates RhoA activity and hyperalgesia to noxious thermal and inflammatory stimuli. *Neuro-Signals* **20**, 112-126
47. Ko, F. C., Chan, L. K., Tung, E. K., Lowe, S. W., Ng, I. O., and Yam, J. W. (2010) Akt phosphorylation of deleted in liver cancer 1 abrogates its suppression of liver cancer tumorigenesis and metastasis. *Gastroenterology* **139**, 1397-1407
48. Kuroda, S., Fukata, M., Kobayashi, K., Nakafuku, M., Nomura, N., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996) Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. *J Biol Chem* **271**, 23363-23367
49. Strassheim, D., May, L. G., Varker, K. A., Puhl, H. L., Phelps, S. H., Porter, R. A., Aronstam, R. S., Noti, J. D., and Williams, C. L. (1999) M3 muscarinic acetylcholine receptors regulate cytoplasmic myosin by a process involving RhoA and requiring conventional protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* **274**, 18675-18685

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1: WWP1 interacts with STARD13**

(A) WWP1 interacts with STARD13. HEK293 cells were transfected with Flag-WWP1 together with Myc-STARD13 and the association of STARD13 with WWP1 was analyzed by coimmunoprecipitation. In all the following experiments, the expression of transfected DNA was determined by immunoblotting total-cell lysates with the appropriate antibodies.

(B) START domain of STARD13 is responsible for binding to WWP1. HEK293 cells were transfected with Flag-WWP1 either alone or together with full length or fragments of Myc-STARD13 as indicated. Cells were immunoprecipitated with anti-Myc antibody and immunoblotted with anti-Flag antibody.

(C) C2 domain of WWP1 is responsible for binding to STARD13. HEK293 cells were transfected with Myc-STARD13 either alone or together with full length or fragments of Flag-WWP1 as indicated. Cells were immunoprecipitated with anti-Flag antibody and immunoblotted with anti-Myc antibody.

(D) Endogenous association of endogenous WWP1 and STARD13. MCF-7 cells were transfected with a nontarget siRNA (siNT) or a siRNA targeting STARD13 (siSTD13) and the association between endogenous WWP1 and STARD13 was analyzed by coimmunoprecipitation.

(E) WWP1 colocalizes with STARD13 in the cytoplasm. MCF-7 cells were transfected with Flag-WWP1 and Myc-STARD13. Cells were analyzed by immunofluorescence microscopy using anti-Flag and anti-STARD13 to visualize WWP1 and STARD13, respectively.

### **Figure 2: WWP1 does not induce STARD13 degradation**

(A) WWP1 does not catalyze STARD13 polyubiquitination. HEK293 cells were transfected with Myc-STARD13 together with His-Ub and Flag-WWP1 or HA-T $\beta$ RI. act together with His-Ub, Flag-WWP1 and Smad7. Lysates were pulled down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-Myc or anti-HA antibodies.

(B) Expression of WWP1 does not decrease the steady-state levels of STARD13. HEK293 cells were transfected with Myc-STARD13 together with increased amounts of Flag-WWP1. Steady-state levels of STARD13 were determined by direct immunoblotting.

(C) Depletion of WWP1 does not increase STARD13 protein levels. MCF-7 cells were transfected with siNT or two individual siRNA targeting WWP1 (siWWP1). The expression of endogenous WWP1 and STARD13 was monitored by immunoblotting.

(D) Depletion of STARD13 increased WWP1 protein levels. Left panel, MCF-7 cells were transfected with siNT or two individual siRNA targeting STARD13 (siSTARD13). Right panel, MDA-MB-231 cells were stably transfected with ShCont (MDA-MB-231-ShCont) or shSTARD13 (MDA-MB-231-ShSTARD13). The expression of endogenous WWP1 and STARD13 was monitored by direct immunoblotting.

(E) STARD13 induced WWP1 polyubiquitination. HEK293 cells were transfected with His-Ub together with Flag-WWP1 and increasing amounts of Myc-STARD13. Cell lysates were pulled down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-Flag antibody.

### **Figure 3: WWP1 interacts with STARD13 to induce RhoA degradation**

(A) WWP1 interacts with RhoA. HEK293 cells were transfected with HA-RhoA together with Flag-WWP1 or Flag-WWP1.C890A, and the association of HA-RhoA with Flag-WWP1 or Flag-WWP1.C890A was analyzed by coimmunoprecipitation.

(B) Association of endogenous WWP1 and RhoA. MCF-7 cell lysates were immunoprecipitated with either IgG or anti-RhoA antibody before being immunoblotted with anti-WWP1 antibody.

(C, D, E) Expression of WWP1 in combination with STARD13 decreases the steady-state levels of RhoA. MCF-7 cells were transfected with the indicated combinations of expression vectors (C, D, E) and treated with cycloheximide (CHX) for the indicated time (E). RhoA stability was analyzed by immunoblotting with anti-HA antibody. Cells were also cotransfected with GFP as a control of transfection efficiency.

(F) Expression of WWP1 with STARD13 decreases specifically the steady-state levels of RhoA. MCF-7 cells were transfected with HA-RhoA, Myc-Cdc42 or Myc-Rac1 together with STARD13 in the presence or absence of WWP1 and analyzed by immunoblotting.

### **Figure 4: WWP1 interacts with STARD13 to induce RhoA ubiquitination**

(A) WWP1 induces RhoA polyubiquitination. MCF-7 cells were transfected with HA-RhoA together with His-Ub, Flag-WWP1 or Flag-WWP1.C890A. Cell lysates were pulled down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-HA antibody.

**(B)** STARD13 increases WWP1-induced RhoA polyubiquitination. MCF-7 cells were transfected with HA-RhoA, His-Ub, Flag-WWP1 and increasing amounts of Myc-STARD13. Cell lysates were pulled down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-HA antibody.

**(C)** Depletion of STARD13 inhibits WWP1-induced RhoA polyubiquitination. MDA-MB-231 and STARD13-silenced breast cancer cells (MDA-MB-231-ShSTD13) were transfected with a combination of HA-RhoA, His-Ub and Flag-WWP1. Cell lysates were pulled down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-HA antibody.

**(D)** Depletion of STARD13 inhibits WWP1-induced RhoA degradation. MCF-7 cells were transfected with siNT or two individual siRNA targeting STARD13 (siSTD13), prior to be transfected with HA-RhoA and Flag-WWP1. Steady-state levels of RhoA were determined by immunoblotting.

**Figure 5: STARD13 is required for WWP1-mediated degradation of the activated form of RhoA**

**(A)** Activation of Rho increases the WWP1/RhoA interaction. MCF-7 cells transfected with HA-RhoA and Flag-WWP1 were treated for 4 hr either with Rho activator or Rho inhibitor and the association of HA-RhoA with Flag-WWP1 was analyzed by coimmunoprecipitation.

**(B)** Activation of Rho increases the endogenous WWP1/RhoA interaction. MCF-7 cells were treated with or without Rho activator for 4 hr and cell lysates were immunoprecipitated with either IgG or anti-RhoA antibody followed by immunoblotting with anti-WWP1 antibody.

**(C)** WWP1 in collaboration with STARD13 induces degradation of activated RhoA. MCF-7 cells were transfected with constitutively active RhoA (HA-RhoA.CA) or dominant negative RhoA (HA.RhoA.DN) together with STARD13 and increasing amounts of WWP1. RhoA stability was analyzed by immunoblotting with anti-HA antibody.

**(D)** WWP1 in collaboration with STARD13 induces polyubiquitination of activated RhoA. MCF-7 cells were transfected with HA-RhoA.CA or HA.RhoA.DN together with the indicated combinations of His-Ub, WWP1 and STARD13. Cell lysates were pulled down with nickel-agarose and immunoblotted with anti-HA antibody.

**(E)** Silencing of WWP1 and STARD13 leads to endogenous RhoA activation. Levels of endogenous active RhoA from control and STARD13-silenced or WWP1-silenced breast cancer cell lines were determined by GST pull-down (PD) assays with GST-Rhotekin-RBD followed by immunoblotting with anti-RhoA antibody.

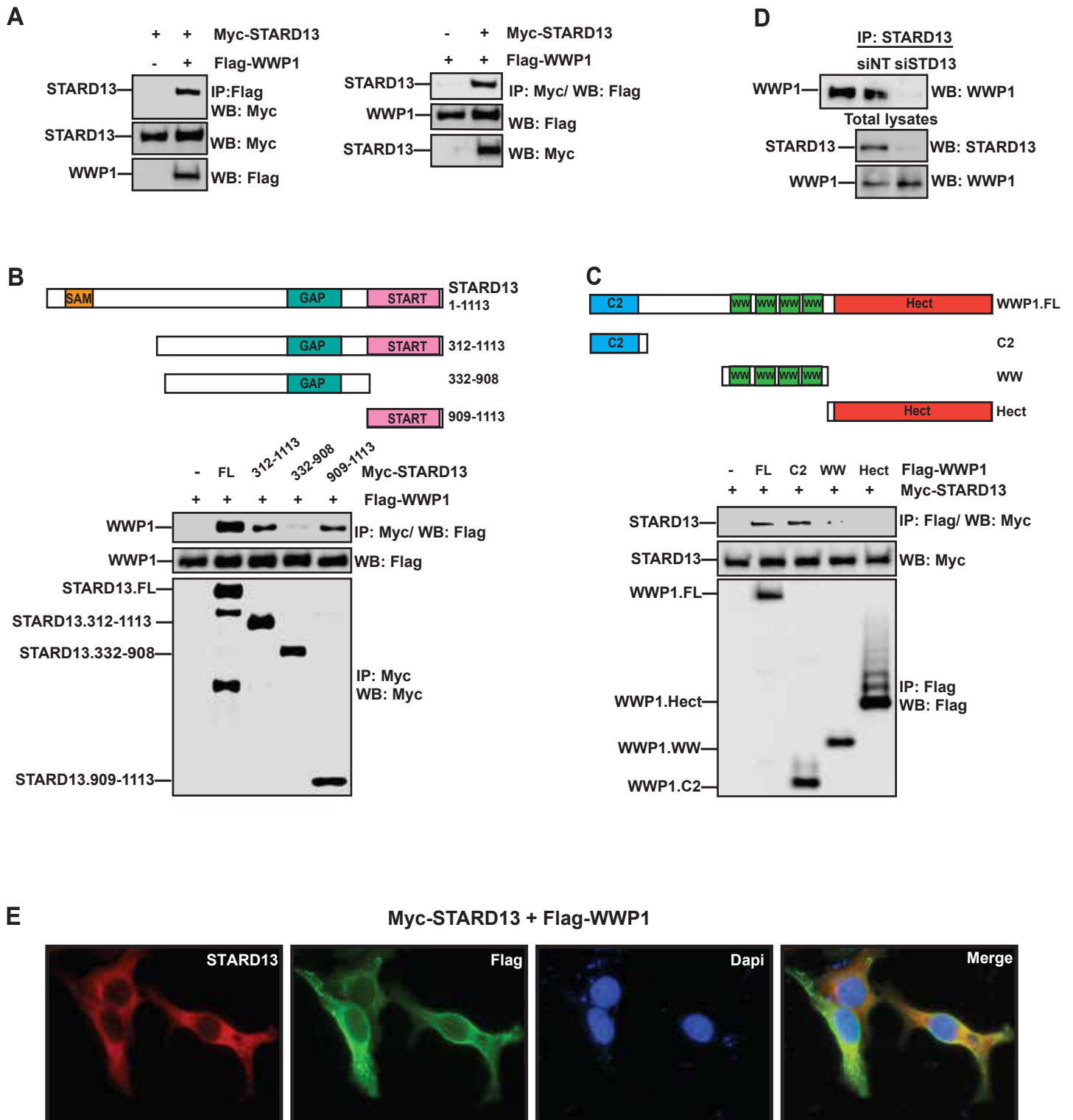
(F) Cells expressing WWP1 displayed a weaker staining for the activated form of RhoA. MCF-7 cells were transfected with HA-RhoA.CA and Flag-WWP1. Then, cells were stained with anti-Flag and anti-HA antibodies and visualized under a fluorescence microscope.

**Figure 6: WWP1 regulates cell migration of breast cancer cells**

(A) Silencing of WWP1 induces actin cytoskeleton rearrangements. MCF-7 cells were transfected with siNT or two individual siRNA targeting WWP1 (siWWP1). F-actin was visualized by red-phalloidin staining.

(B, C, D) Knockdown of endogenous WWP1 and STARD13 in breast cancer cells results in enhanced migration. Confluent MCF-7 cells transfected with siNT, siWWP1, and siSTD13 (B, C), or MDA-MB-231ShCont and MDA-MB-231ShWWP1 cells (D) were wounded and left to recover the wound in the absence or presence of the Rho inhibitor for 20 hr, and imaged after 20 hr. The width of 4 scratches was analyzed for each culture. Graphs represent the average ratio of wound closure. Error bars indicate SD. Student's-t test was performed and significant differences between control and siRNA cells and cells treated or not with the Rho inhibitor are reported.

Figure 1



**Figure 2**

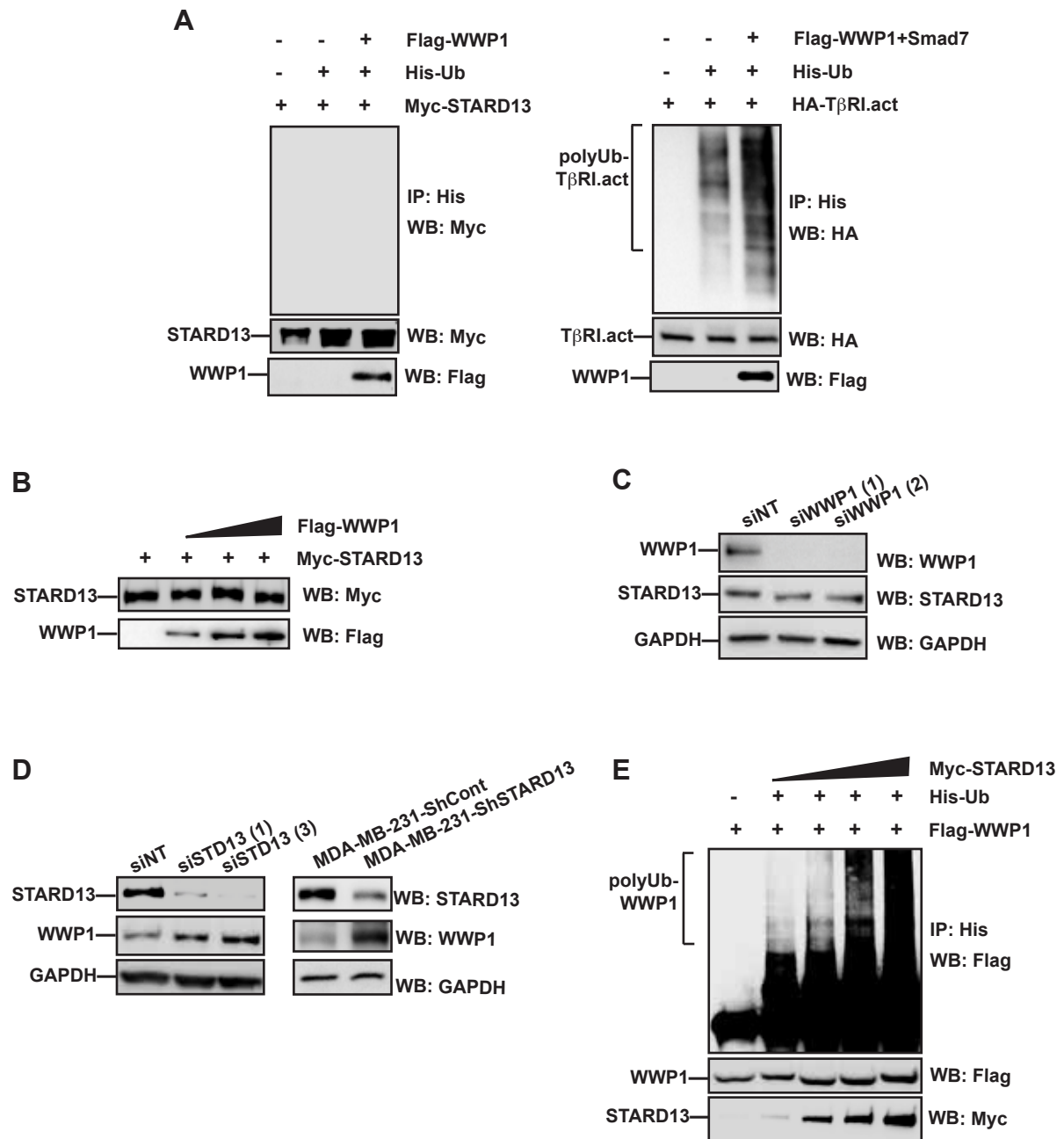


Figure 3

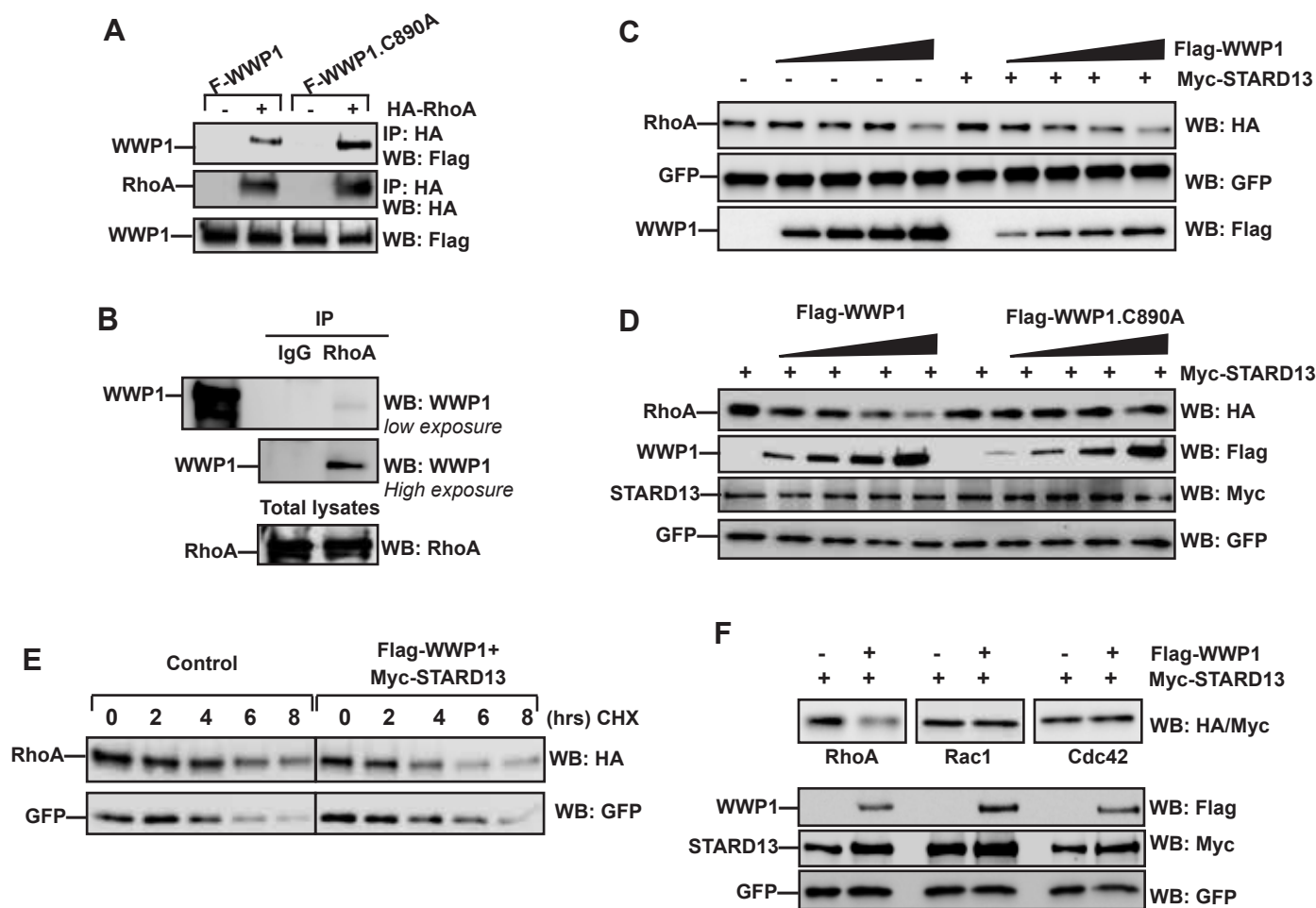
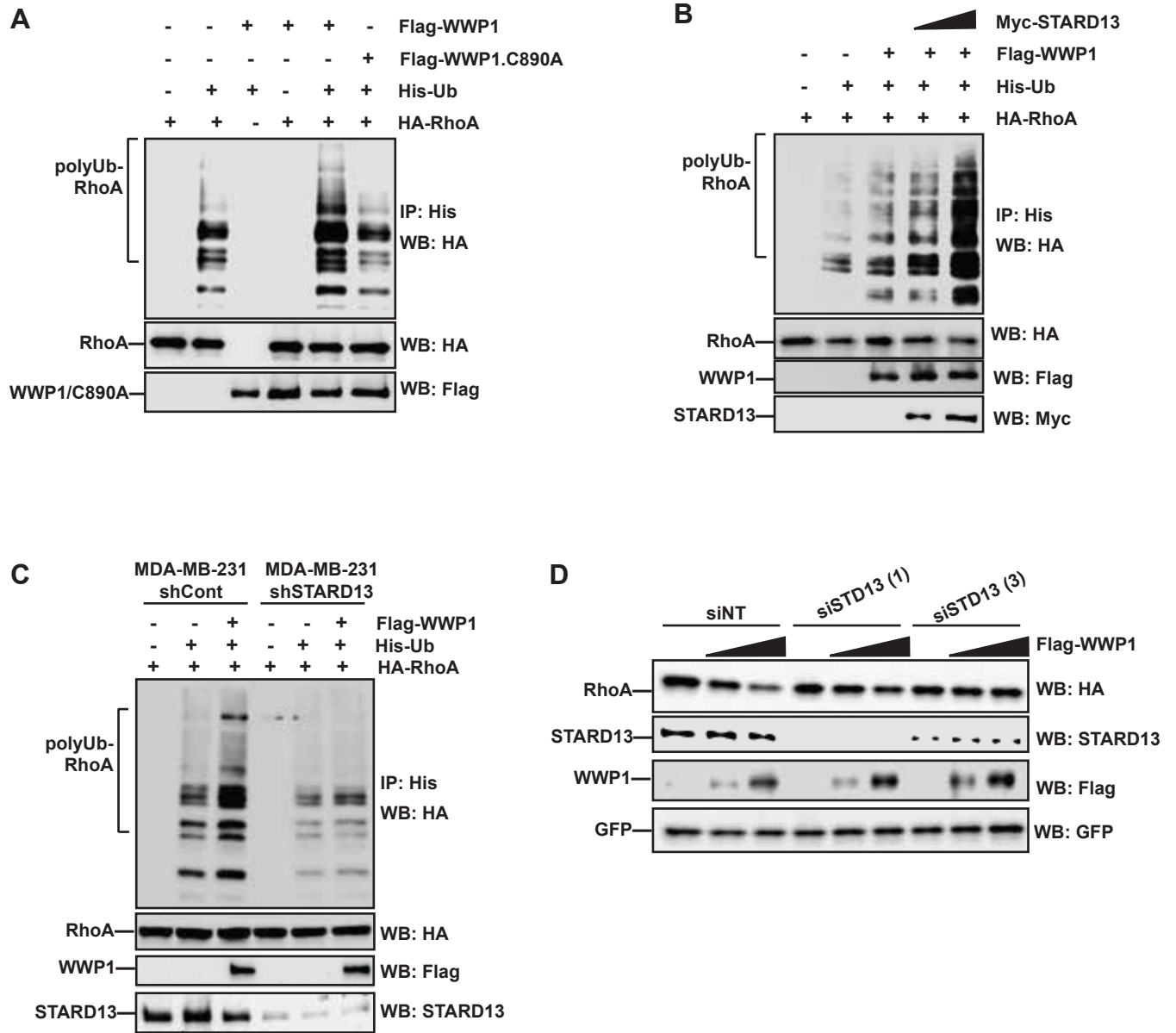




Figure 4



**Figure 5**

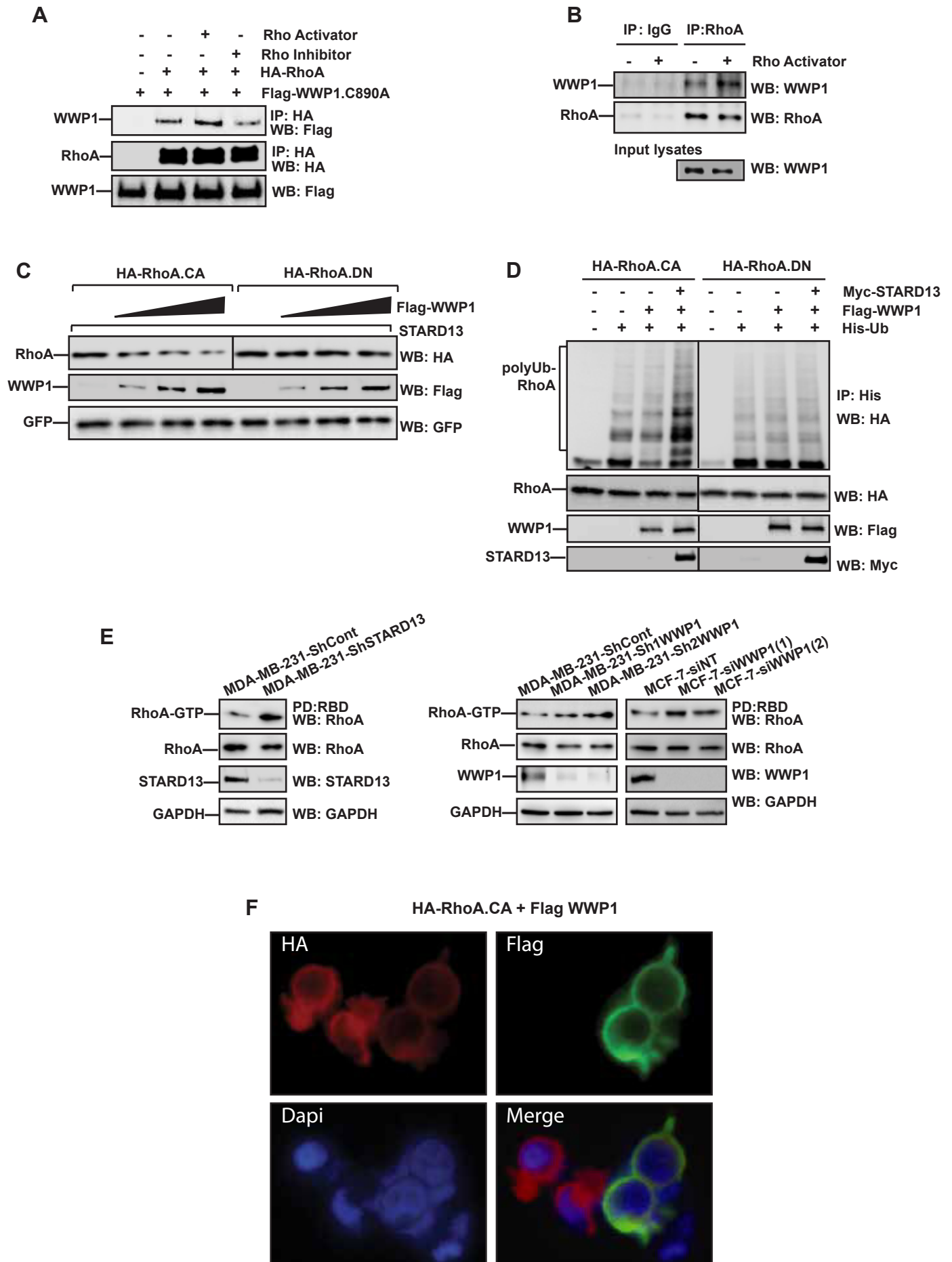
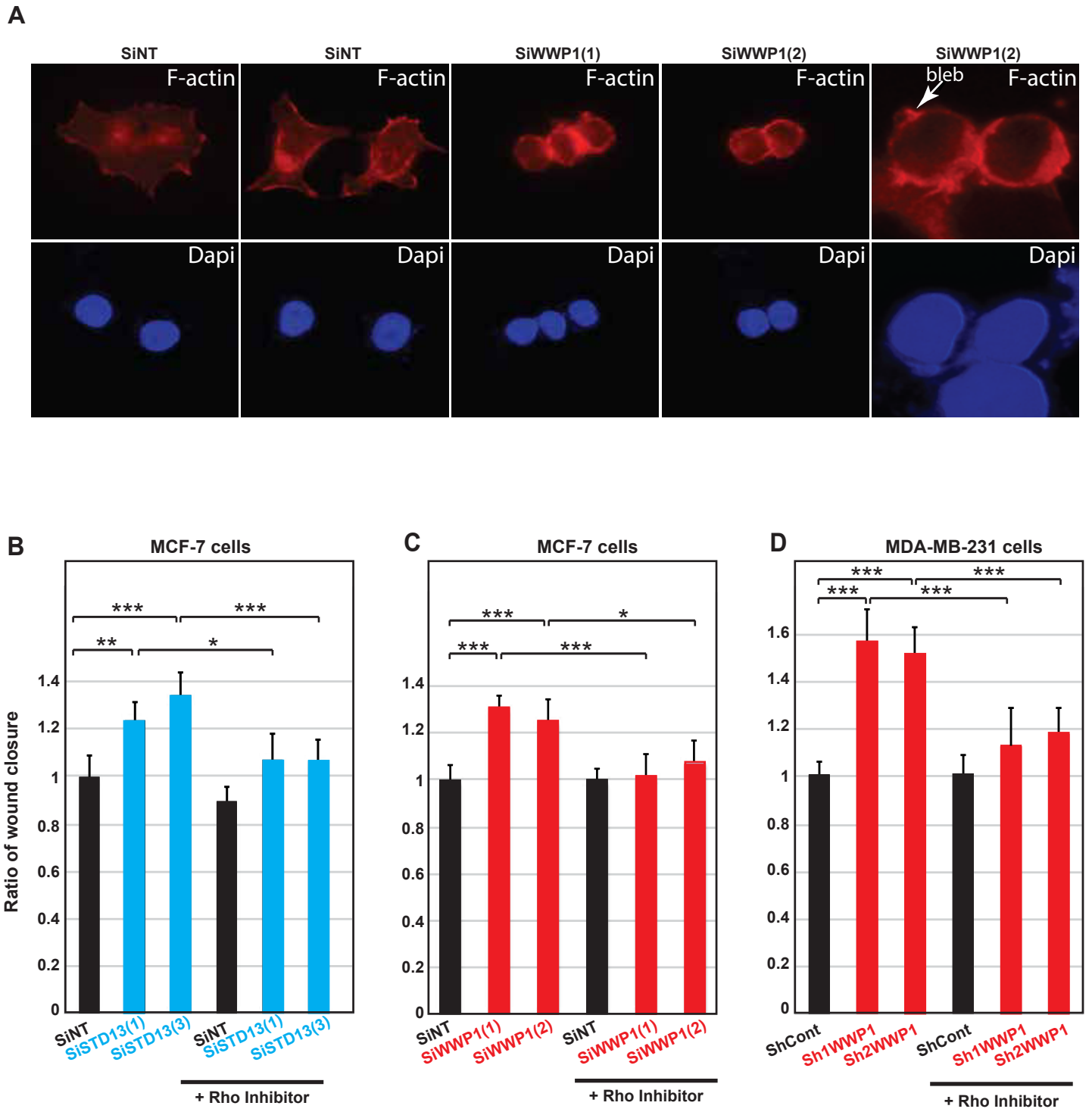


Figure 6



## DISCUSSION

---

La voie de signalisation du TGF- $\beta$  joue un rôle essentiel, mais complexe, dans la cancérogenèse. Elle est à la fois anti-tumorale dans les premiers stades de la cancérogenèse mais favorise aussi la progression tumorale dans les stades plus tardifs en induisant notamment la migration cellulaire, la transition épithélio-mesenchymateuse, l'échappement du système immunitaire ou la formation de métastases. Mon laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à la régulation de la signalisation TGF- $\beta$  afin d'en identifier de nouveaux modulateurs susceptibles d'être impliqués dans les processus cancéreux. Dans ce contexte, il a découvert plusieurs E3 ubiquitine ligases capables de réguler cette voie de signalisation. L'ubiquitination des protéines est une modification post-traductionnelle majeure qui entraîne des conséquences variées sur le devenir des protéines, la plus courante étant la dégradation des protéines consécutive à leur polyubiquitination. Mon laboratoire a en particulier identifié la E3 ubiquitine ligase WWP1/Tiul1 comme étant une protéine inhibitrice de la signalisation TGF- $\beta$  (Seo, Lallemand et al. 2004). Cette observation a également été faite dans deux autres laboratoires, de manière indépendante (Komuro, Imamura et al. 2004, Moren, Imamura et al. 2005). De plus, WWP1 semble également être impliquée dans la cancérogenèse. En effet, le gène *WWP1* présente une amplification génique dans de nombreuses tumeurs mammaires et prostatiques. D'un point de vue fonctionnel, WWP1 peut induire la prolifération de cellules cancéreuses mammaires et prostatiques. Il a également été montré que WWP1 régulait la stabilité de nombreuses protéines impliquées dans le cancer (Chen, Sun et al. 2007, Chen, Zhou et al. 2007, Chen, Zhou et al. 2009). Pour toutes ces raisons, WWP1 semble être un candidat intéressant dans la cancérogenèse liée au TGF- $\beta$ . Mon laboratoire a donc poursuivi son étude, en essayant de mieux caractériser son rôle dans la cellule normale mais également en cherchant à comprendre comment sa dérégulation pouvait être impliquée dans la cancérogenèse.

Mes travaux de thèse se sont donc inscrits dans ce contexte et avaient pour but d'identifier la régulation et de nouvelles fonctions cellulaires de la E3 ubiquitine ligase WWP1. Ma thèse s'est axée autour de deux projets, le premier projet portant sur l'étude de la régulation de l'activité catalytique de WWP1, le second sur l'étude du rôle de WWP1 avec son nouveau partenaire STARD13, identifié dans le laboratoire.

La régulation de l'activité catalytique de plusieurs membres de la famille des E3

ubiquitine ligases à domaines HECT Nedd4 a été caractérisée, cependant aucune étude ne s'était intéressée à WWP1. Lors de la première partie de ma thèse, j'ai donc cherché à comprendre les mécanismes qui contrôlent l'activité catalytique de WWP1. J'ai observé qu'à l'état basal, l'activité ligase de polyubiquitination de WWP1 est inhibée par ses domaines C2 et WW. Le domaine C2 forme une interaction intramoléculaire avec le domaine catalytique HECT. En revanche, les domaines WW ne sont, eux, pas capables de s'associer avec le domaine HECT, malgré la présence d'un motif PPxY dans ce dernier. La E3 ubiquitine ligase Smurf2, qui fait également partie de la famille des E3 à domaine HECT de la famille Nedd4, possède, elle aussi, un motif PPxY dans son domaine HECT. Cependant, comme WWP1, celui-ci ne permet pas d'association avec ses domaines WW (Wiesner, Ogunjimi et al. 2007). Néanmoins, nos travaux suggèrent que les domaines WW de WWP1 participent tout de même à l'inhibition de l'activité catalytique de polyubiquitination de WWP1. En présence de la protéine adaptatrice Smad7, cette auto-inhibition de WWP1 est levée, WWP1 peut alors catalyser la polyubiquitination de ses substrats, ainsi que la sienne. Il serait intéressant de vérifier si d'autres protéines adaptatrices ou substrats de WWP1 sont également capables de lever son auto-inhibition.

La majorité des E3 ubiquitine ligases polyubiquitinent leurs substrats mais catalysent également leur propre ubiquitination. Ce mécanisme de régulation permet à la protéine WWP1 de se maintenir à un niveau suffisant dans la cellule et d'éviter sa dégradation suite à son auto-polyubiquitination. Ainsi, le niveau protéique de WWP1 reste stable dans la cellule et WWP1 est disponible pour ubiquitiner ses substrats lorsque cela devient nécessaire. Cette étude a donc permis pour la première fois d'identifier un mécanisme de régulation de l'activité catalytique de WWP1. Il est intéressant de noter que ce mécanisme n'est pas unique dans la famille des E3 ligases de la famille Nedd4. En effet, il a été montré que l'activité catalytique de Smurf2 est également régulée par une interaction entre ses domaines C2 et HECT (Wiesner, Ogunjimi et al. 2007). Cependant, il existe aussi des différences puisque pour les E3 ubiquitine ligases Nedd4-2 et AIP4/Itch, ce sont des interactions intramoléculaires entre les domaines WW et HECT qui ont été décrites (Gallagher, Gao et al. 2006, Bruce, Kanelis et al. 2008). Les membres de cette famille de E3 ubiquitine ligases, présentent tous la même structure C2-WW-HECT, qui diffère seulement dans leur nombre de domaines WW, de deux à quatre. Il est donc possible que le nombre de ces domaines WW soit un paramètre qui intervient dans les interactions intramoléculaires de ces E3 ligases de la famille Nedd4 et qui conditionne leur activité catalytique.

Bien que le gène *WWP1* soit amplifié dans plus de 30% des cancers du sein et de la prostate, il est assez rarement muté. Nous avons néanmoins observé qu'un mutant de WWP1 découvert dans une tumeur de la prostate présentait une dérégulation de son activité catalytique. Il s'agit d'un mutant de WWP1 présentant une substitution d'un résidu glutamate en valine à la position 798 (WWP1.E798V), dans son domaine catalytique HECT (Chen, Sun et al. 2007). Ainsi, à l'état basal, les domaines C2 et WW de ce mutant ne sont plus capables d'inhiber le domaine HECT, le mutant WWP1.E798V est donc plus fortement polyubiquitiné que la protéine sauvage WWP1, même en absence de substrat. De même, la mutation E798V entraîne une activité catalytique plus importante de WWP1 envers le récepteur T $\beta$ RI activé. D'un point de vue fonctionnel, nous avons montré que la surexpression de WWP1.E798V dans des cellules prostatiques normales RWPE permettait d'inhiber plus efficacement l'effet anti-prolifératif du TGF- $\beta$ , ce qui conférerait à ces cellules la propriété de proliférer plus rapidement. En échappant à son mécanisme d'auto-inhibition, WWP1.E798V acquiert donc une activité catalytique constitutive qui pourrait lui conférer des propriétés oncogéniques durant la cancérogenèse. Une étude plus approfondie de ce mutant permettrait de révéler si l'augmentation de son activité catalytique lui permet également de cibler plus efficacement certains autres de ses substrats, notamment ceux impliqués dans la cancérogenèse. Il serait également très intéressant de chercher si la mutation E798V décrite pour WWP1 est retrouvée dans d'autres tumeurs prostatiques ou mammaires, WWP1 étant à ce jour impliquée essentiellement dans ces cancers. La recherche de cette mutation pourrait aussi se faire dans des banques de tumeurs provenant d'autres types de cancers où WWP1 n'est pas surexprimée, mais où l'altération de l'activité de WWP1 pourrait tout de même jouer un rôle dans la cancérogenèse, notamment *via* la dérégulation de la signalisation TGF- $\beta$ .

De nombreux projets cliniques ont pour but d'inhiber les effets pro-métastatiques du TGF- $\beta$  (Connolly, Freimuth et al. 2012). Néanmoins, les molécules développées ciblent principalement le TGF- $\beta$  lui-même, ou encore les récepteurs du TGF- $\beta$ , entraînant une inhibition globale de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ . Par exemple, le Trabedersen (Antisense Pharma GmbH) est un oligonucléotide antisens qui inhibe l'expression du TGF2. Cet oligonucléotide a été testé en phase clinique III, tout d'abord dans les gliomes de haut-grade puis dans d'autres types de cancers, notamment du pancréas, du côlon ou des mélanomes de stades avancés. Ces molécules sont très intéressantes mais peuvent avoir des effets secondaires trop nombreux. Pour ces raisons, la recherche de molécules thérapeutiques qui

ciblent des éléments en aval des récepteurs au TGF- $\beta$ , plus spécifiques de certains effets du TGF- $\beta$ , est devenue un enjeu important.

En 2003, la Food and Drug Administration (FDA), suivi de l'Union Européenne en 2005, a autorisé la mise sur le marché du Bortezomib, un inhibiteur réversible du protéasome 20S, dans les myélomes multiples à rechutes et certains lymphomes (lymphomes du manteau) pour lesquels les traitements existants n'étaient pas efficaces (Dou and Zonder 2014). Cette drogue a eu un grand succès dans le traitement de ces cancers. Néanmoins, l'usage de cet inhibiteur est limité, à cause de ses effets secondaires indésirables et surtout des résistances que développent les tumeurs à son effet. Des inhibiteurs de deuxième génération (le Carfilzomib) ont depuis été développés, notamment pour traiter les tumeurs résistantes au Bortezomib. Depuis son utilisation en clinique dans des myélomes et lymphomes, des études ont montré que le Bortezomib pouvait inhiber la prolifération de cellules cancéreuses prostatiques PC3 ainsi que la formation de tumeurs dans des souris nude athymiques par injection sous-cutanée de ces cellules (Williams, Pettaway et al. 2003, Wang, Wang et al. 2014). De manière très intéressante, il semble que le Bortezomib agisse également en inhibant directement l'expression de plusieurs E3 ubiquitine ligases, et notamment WWP1, dans les cellules PC3, par un mécanisme encore inconnu (Wang, Wang et al. 2014). Ces résultats suggèrent qu'inhiber le protéasome permettrait donc non seulement de stabiliser les substrats polyubiquitinés et dégradés par WWP1 mais également de réduire directement l'expression de WWP1. Les succès de ces inhibiteurs du protéasome ont conduit au développement de nouvelles stratégies, certaines donnant lieu à des études précliniques, ciblant de manière plus précise d'autres éléments du système ubiquitine-protéasome.

Le développement d'inhibiteurs de E3 ubiquitine ligases est l'une d'entre-elles. Les E3 ligases sont responsables de l'attachement de l'ubiquitine sur le substrat. Il en existe plus de 600 dans la cellule, alors qu'il n'existe que deux enzymes E1 d'activation et une trentaine d'enzymes E2 de ligation. Ce sont donc elles qui permettent la spécificité de la réaction d'ubiquitination pour un substrat. Cibler ces E3 ligases en thérapeutique pourrait donc permettre d'obtenir des effets plus spécifiques que d'inhiber le protéasome (Landre, Rotblat et al. 2014). L'un des moyens pour cibler les E3 ubiquitine ligases est d'inhiber leur interaction avec leur substrat. Cette stratégie a été appliquée à la E3 ligase RING Mdm2. Mdm2 est connue pour conduire à la polyubiquitination et la dégradation de p53, un suppresseur de tumeur majeur. Plusieurs familles de molécules ont été utilisées pour cibler Mdm2. L'une de ces familles, les Nutlins, inhibe l'interaction entre Mdm2 et p53, et est testée

en phase clinique I sur les liposarcomes, un type de sarcomes des tissus mous. Les résultats de la première étude clinique n'ont montré qu'une réponse partielle et pour très peu de patients. Néanmoins, d'autres études cliniques sont en cours pour cette famille de molécules, et d'autres, ciblant Mdm2 (Landre, Rotblat et al. 2014).

Il est intéressant de noter qu'il existe plusieurs moyens de bloquer l'activité des E3 ubiquitine ligases. Ainsi, inhiber leurs liaisons à l'ubiquitine ou à l'enzyme E2 sont également des possibilités. Les E3 ligases de la famille HECT peuvent aussi être ciblées au niveau de leur activité catalytique propre, cela les différencie des E3 ubiquitine ligases de la famille RING qui agissent plus comme des adaptateurs entre l'enzyme E2 de conjugaison et le substrat. Récemment, un inhibiteur des E3 ligases HECT Smurf2, Nedd4, Huwe1 et WWP1 a ainsi été identifié (Mund, Lewis et al. 2014). Mund et ses collaborateurs ont tout d'abord découvert une famille de peptides inhibant ces E3 ubiquitine ligases en empêchant leur interaction avec les enzymes E2. Ces peptides étant difficilement administrables chez l'Homme, ils les ont utilisés comme outils dans un crible de petites molécules inhibant la liaison de ces peptides aux E3 ligases et ont découvert la petite molécule Heclin (Hect Ligase Inhibitor), capable d'inhiber cette liaison ainsi que l'activité catalytique de ces E3 ubiquitine ligases. Le mécanisme moléculaire n'est pas précisément défini mais il semble que Heclin puisse se fixer au lobe C-terminal du domaine HECT. Ceci entraîne l'oxydation du résidu cystéine catalytique du domaine HECT et inhibe le transfert de l'ubiquitine de la E2 au domaine HECT de la E3 ligase. L'étude de tels inhibiteurs pourrait être très utile dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques, notamment dans le traitement des cancers. Dans ce contexte, la description d'un mécanisme de régulation de l'activité catalytique de WWP1 ainsi que d'une mutation ponctuelle de WWP1, détectées dans une tumeur cancéreuse de la prostate est très intéressante car elle permet de révéler les acides aminés essentiels à l'activité catalytique de WWP1. Cela pourrait permettre de développer des molécules thérapeutiques qui soient propres à WWP1.

Aujourd'hui, les stratégies mises en place d'inhibition globale de la voie TGF- $\beta$  ou du protéasome se heurtent à des effets secondaires importants. Améliorer la spécificité des cibles thérapeutiques pourrait ainsi permettre le développement de nouveaux traitements anti-cancéreux plus efficaces.

Au cours du second projet réalisé lors de ma thèse, je me suis intéressé à un nouveau partenaire potentiel de WWP1, la RhoGAP STARD13. STARD13 a été identifiée dans un crible double-hybride réalisé dans mon laboratoire, avec les services de la société



Hybrigenics, afin de trouver de nouveaux partenaires de WWP1. Notre étude confirme que la RhoGAP STARD13 est bien un nouvel interactant de la E3 ligase WWP1 dans la cellule eucaryote. Concernant son mécanisme d'action, nous avons montré que STARD13 agit comme un adaptateur entre WWP1 et la protéine RhoA. STARD13 permet à WWP1 de s'associer à la forme activée de RhoA, de la polyubiquitiner, et d'induire ainsi sa dégradation. WWP1 s'ajoute donc aux trois E3 ubiquitine ligase (Smurf1, Cullin3 et SCF<sup>FBX19</sup>) déjà décrites dans la littérature comme induisant la dégradation des formes activées et/ou inactives de RhoA (Wang, Zhang et al. 2003, Chen, Yang et al. 2009, Wei, Mialki et al. 2013). Etant donné que RhoA est impliquée dans des processus cellulaires clés, son activité doit être finement contrôlée dans le temps et dans la cellule. Il ne paraît donc pas surprenant que plusieurs E3 ubiquitine ligases soient nécessaires pour réguler sa dégradation et ainsi permettre un meilleur contrôle spatio-temporel de ces différents rôles dans la cellule. Il existe de nombreux exemples de substrats qui sont dégradés suite à la polyubiquitination par plusieurs E3 ubiquitine ligases, Rac1 est par exemple polyubiquitiné par les E3 ligases RING IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) et SCFFBXL19, ou la E3 ligase HACE1 (HECT domain and ankyrin containing E3 ubiquitin ligase 1) (Mettouchi and Lemichez 2012, Oberoi, Dogan et al. 2012, Zhao, Mialki et al. 2013).

Nos résultats montrent que WWP1 agit en synergie avec STARD13, pour induire la dégradation de RhoA. Plusieurs études ont révélé que STARD13 possède une activité RhoGAP envers les GTPases RhoA et Cdc42. Or, nos résultats semblent montrer que WWP1, en association avec STARD13, n'entraîne pas la dégradation de Cdc42. Ceci suggère que WWP1 s'associe uniquement aux « pools » de STARD13 associé à RhoA dans la cellule. Des études complémentaires pourraient être réalisées pour vérifier cette hypothèse et, si c'est le cas, pour déterminer pourquoi WWP1 ne s'associe pas à STARD13 lié à Cdc42 dans la cellule.

STARD13 est actuellement décrit dans la littérature comme un suppresseur de tumeur dans différents types de cancers, et notamment les cancers du sein. Notre étude permet de mettre en évidence un nouveau rôle de cette RhoGAP sur la GTPase RhoA qui conforte son rôle suppresseur de tumeur. En effet, nos résultats montrent pour la première fois qu'une protéine RhoGAP peut faciliter la dégradation d'une RhoGTPase. En effet, en plus de réguler RhoA en induisant son inactivation, STARD13 peut aussi participer à sa dégradation, régulant par cette même occasion son taux protéique dans la cellule. Ceci montre que les protéines RhoGAP ne sont pas uniquement des régulateurs de l'activité des RhoGTPases mais qu'elles

peuvent aussi participer à d'autres régulations de ces RhoGTPases, en association avec différents partenaires.

Cette étude permet également de révéler un nouveau substrat de WWP1 dans la cellule, la GTPase RhoA. Il s'agit du premier substrat de WWP1 jouant un rôle sur le cytosquelette, mise à part la protéine Ezrin, mais il semble que l'ubiquitination de Ezrin par WWP1 n'ait pas de conséquences directes sur le cytosquelette (Zaarour, Chirivino et al. 2012). Nous nous sommes donc intéressé aux répercussions de cette dégradation de RhoA par WWP1 dans la cellule. La GTPase RhoA est un régulateur majeur du cytosquelette d'actine et joue donc un rôle important durant la migration cellulaire. La migration cellulaire est un mécanisme très important pour les cellules cancéreuses, qui leur permet notamment, après avoir subi une transition épithélio-mésenchymateuse, de quitter la tumeur primaire et de disséminer dans l'organisme pour former des métastases. Nous avons alors testé la capacité de migration de cellules cancéreuses mammaires MDA.MB.231 et MCF7, dont l'expression de WWP1 est diminuée par transfection de siRNA ou shRNA dirigés contre WWP1. Nos résultats indiquent que WWP1 est un inhibiteur de la migration cellulaire dans ces cellules cancéreuses mammaires. De plus, ce phénomène est reversé par un inhibiteur de Rho, suggérant que WWP1 inhibe la migration cellulaire, au moins en partie, grâce à son rôle sur la GTPase RhoA. Pour l'instant, il a essentiellement été décrit un rôle oncogénique de WWP1 sur la prolifération et la survie cellulaire lors des stades précoces de la cancérogenèse. Notre étude prédit également un rôle de WWP1 lors de la migration cellulaire dans les stades plus tardifs de la cancérogenèse. Cette observation est en accord avec l'étude menée par Subik et ses collaborateurs, seule étude à ce jour qui décrit un rôle de WWP1 dans la formation des métastases (Subik, Shu et al. 2012). En effet, ils ont montré que des souris nude athymiques, ayant subies une injection intracardiaque de cellules cancéreuses mammaires MDA.MB.231 dont l'expression de WWP1 est diminuée par transfection de shRNA, présentaient plus de métastases osseuses et de lésions ostéolytiques dans les os que les souris contrôles. Ce résultat apparaît spécifique de WWP1 puisque cette observation n'est pas retrouvée lorsque c'est l'expression de AIP4, une E3 ubiquitine ligase structurellement très proche de WWP1, qui est diminuée. Il semble donc que WWP1 réduise la formation de métastases osseuses issues de tumeurs primaires mammaires, une conséquence majeure des cancers du sein. Ceci pouvait paraître surprenant au vu des propriétés prolifératives et anti-apoptotiques, donc plutôt oncogéniques, décrites jusque là pour WWP1. Néanmoins, nos résultats sur le rôle de WWP1 sur la migration suggèrent que WWP1 pourrait bien avoir un rôle anti-métastatique dans les

stades tardifs de la cancérogenèse.

Pour expliquer cette augmentation de métastases osseuses en absence de WWP1, Subik et ses collaborateurs proposent que WWP1 dégrade la protéine CXCR4, un récepteur transmembranaire couplé aux protéines G. CXCR4 peut induire la migration cellulaire dans des régions riches en chémokine CXCL12, ce qui est le cas de la moelle osseuse, et ainsi favoriser les métastases osseuses (Subik, Shu et al. 2012). Ces résultats sont confortés par une étude du même groupe où les auteurs montrent que des cellules BMSC (Bonne Marrow Stem Cells) WWP1<sup>-/-</sup>, issues de souris dont le gène *WWP1* a été invalidé (souris *WWP1*<sup>-/-</sup>), ont une migration dépendante de CXCL12/CXCR4 accrue (Subik, Shu et al. 2012, Shu, Zhang et al. 2013). Il est intéressant de noter que l'activation de la voie CXCL12/CXCR4 entraîne également une activation de la GTPase RhoA (Bartolome, Galvez et al. 2004, Struckhoff, Rana et al. 2013). Il se pourrait donc que WWP1 inhibe RhoA directement ou par l'intermédiaire de CXCR4. Pour tester le rôle de la dégradation de RhoA par WWP1 lors de la formation des métastases, il pourrait être intéressant d'injecter des souris nude en intracardiaque, avec des cellules MDA.MB.231 qui surexpriment WWP1, afin d'observer si la surexpression de WWP1 réduit la formation de métastases. L'inhibition de l'expression de STARD13 dans ces mêmes cellules permettra de tester anti-métastatique de WWP1 passe par RhoA.

De plus, les souris WWP1<sup>-/-</sup> représentent également un outil intéressant dans l'étude de WWP1 durant la cancérogenèse mammaire. Ces souris pourraient être croisées avec des souris Neu, des souris transgéniques qui surexpriment l'analogue murin de l'oncogène ErbB2, et développent des tumeurs mammaires ainsi que des métastases pulmonaires. L'établissement de souris Neu/WWP1<sup>-/-</sup> permettrait de confirmer si l'absence de WWP1 favorise le développement des métastases dans ces souris et d'établir ainsi le rôle de WWP1 dans la cancérogenèse mammaire.

En accord avec un potentiel rôle anti-métastatique de WWP1, Nguyen et ses collaborateurs ont observé que les patientes ayant des tumeurs cancéreuses du sein présentant une absence ou une très faible expression de WWP1 avait un plus mauvais pronostic que les patientes ayant des tumeurs exprimant WWP1 (Nguyen Huu, Ryder et al. 2008). Ceci semble indiquer que WWP1 pourrait être un marqueur pronostic dans les cancers du sein. Cette étude a été réalisée sur 300 tumeurs mammaires invasives et 60 tumeurs mammaires *in situ*. Il serait maintenant intéressant de confirmer cette observation en testant un nombre plus important de tumeurs. De plus, dans cette étude, il n'a pas été trouvé de corrélation entre l'expression de

WWP1 et le grade des tumeurs. De même, l'association entre l'expression de WWP1 et le pronostic semble indépendante du statut ER (Estrogen Receptor) ou HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) des tumeurs, indiquant que WWP1 serait un facteur pronostic indépendant de ces marqueurs fréquemment utilisés. Cependant, cette observation n'est pas retrouvée dans une étude provenant d'un autre groupe, qui suggère que l'expression de WWP1 est liée au statut ER<sup>+</sup> des tumeurs (Chen, Zhou et al. 2009). L'étude d'un plus grand nombre de cas est nécessaire pour répondre clairement à cette question. Il serait également intéressant de déterminer s'il existe aussi un lien entre l'expression de WWP1 et le pronostic des patients dans les cancers prostatiques, le gène *WWP1* étant également souvent amplifié dans ces cancers. De même, la survie des patients pourra être évaluée en fonction de l'expression des deux protéines WWP1 et STARD13, afin de déterminer si une combinaison d'expression de WWP1 et STARD13 représente un meilleur indicateur pronostic que l'expression individuelle de WWP1 ou STARD13. On peut penser que des tumeurs dans lesquelles les deux protéines sont exprimées sont de meilleur pronostic que celles dans lesquelles STARD13 et/ou WWP1 sont sous-exprimés. En effet, dans ces tumeurs, RhoA activé devrait être moins dégradé.

Il semble donc que le rôle de WWP1 dans la cancérogenèse soit complexe et que, à l'instar de la signalisation TGF- $\beta$  qu'elle régule, WWP1 puisse avoir un rôle différent, oncogénique ou anti-métastatique, selon les stades de la cancérogenèse. L'approfondissement de cette étude pourrait permettre d'évaluer si WWP1 constitue un facteur pronostic fiable dans les cancers du sein. De même, WWP1 pourrait également constituer une cible thérapeutique pertinente dans les cancers du sein, car plus spécifique que les stratégies actuelles ciblant de manière globale la signalisation TGF- $\beta$  ou le protéasome dans les cancers.

## BIBLIOGRAPHIE

---

Aggarwal, K. and J. Massague (2012). "Ubiquitin removal in the TGF-beta pathway." Nat Cell Biol **14**(7): 656-657.

Akiyoshi, S., H. Inoue, J. Hanai, K. Kusanagi, N. Nemoto, K. Miyazono and M. Kawabata (1999). "c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads." J Biol Chem **274**(49): 35269-35277.

Alarcon, C., A. I. Zaromytidou, Q. Xi, S. Gao, J. Yu, S. Fujisawa, A. Barlas, A. N. Miller, K. Manova-Todorova, M. J. Macias, G. Sapkota, D. Pan and J. Massague (2009). "Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways." Cell **139**(4): 757-769.

Alpy, F., F. Legueux, L. Bianchetti and C. Tomasetto (2009). "[START domain-containing proteins: a review of their role in lipid transport and exchange]." Med Sci (Paris) **25**(2): 181-191.

Alpy, F. and C. Tomasetto (2005). "Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals." J Cell Sci **118**(Pt 13): 2791-2801.

Atfi, A., S. Djelloul, E. Chastre, R. Davis and C. Gespach (1997). "Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling." J Biol Chem **272**(3): 1429-1432.

Atfi, A., E. Dumont, F. Colland, D. Bonnier, A. L'Helgoualc'h, C. Prunier, N. Ferrand, B. Clement, U. M. Wewer and N. Theret (2007). "The disintegrin and metalloproteinase ADAM12 contributes to TGF-beta signaling through interaction with the type II receptor." J Cell Biol **178**(2): 201-208.

Bai, S. and X. Cao (2002). "A nuclear antagonistic mechanism of inhibitory Smads in transforming growth factor-beta signaling." J Biol Chem **277**(6): 4176-4182.

Bartolome, R. A., B. G. Galvez, N. Longo, F. Baleux, G. N. Van Muijen, P. Sanchez-Mateos, A. G. Arroyo and J. Teixido (2004). "Stromal cell-derived factor-1alpha promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities." Cancer Res **64**(7): 2534-2543.

Bedford, L., R. Layfield, R. J. Mayer, J. Peng and P. Xu (2011). "Diverse polyubiquitin chains accumulate following 26S proteasomal dysfunction in mammalian neurones." Neurosci Lett **491**(1): 44-47.

Ben-Saadon, R., D. Zaaroor, T. Ziv and A. Ciechanover (2006). "The polycomb protein Ring1B generates self atypical mixed ubiquitin chains required for its in vitro histone H2A ligase activity." Mol Cell **24**(5): 701-711.

Bhowmick, N. A., M. Ghiassi, A. Bakin, M. Aakre, C. A. Lundquist, M. E. Engel, C. L. Arteaga and H. L. Moses (2001). "Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to

mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism." Mol Biol Cell **12**(1): 27-36.

Bishop, A. L. and A. Hall (2000). "Rho GTPases and their effector proteins." Biochem J **348 Pt 2**: 241-255.

Bitzer, M., G. von Gersdorff, D. Liang, A. Dominguez-Rosales, A. A. Beg, M. Rojkind and E. P. Bottinger (2000). "A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA." Genes Dev **14**(2): 187-197.

Bonni, S., H. R. Wang, C. G. Causing, P. Kavsak, S. L. Stroschein, K. Luo and J. L. Wrana (2001). "TGF-beta induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation." Nat Cell Biol **3**(6): 587-595.

Bourguignon, L. Y. (2001). "CD44-mediated oncogenic signaling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression." J Mammary Gland Biol Neoplasia **6**(3): 287-297.

Bouzahzah, B., C. Albanese, F. Ahmed, F. Pixley, M. P. Lisanti, J. D. Segall, J. Condeelis, D. Joyce, A. Minden, C. J. Der, A. Chan, M. Symons and R. G. Pestell (2001). "Rho family GTPases regulate mammary epithelium cell growth and metastasis through distinguishable pathways." Mol Med **7**(12): 816-830.

Boyer, L., L. Turchi, B. Desnues, A. Doye, G. Ponzio, J. L. Mege, M. Yamashita, Y. E. Zhang, J. Bertoglio, G. Flatau, P. Boquet and E. Lemichez (2006). "CNF1-induced ubiquitylation and proteasome destruction of activated RhoA is impaired in Smurf1-/- cells." Mol Biol Cell **17**(6): 2489-2497.

Braun, A. C. and M. A. Olayioye (2015). "Rho regulation: DLC proteins in space and time." Cell Signal **27**(8): 1643-1651.

Bruce, M. C., V. Kanelis, F. Fouladkou, A. Debonneville, O. Staub and D. Rotin (2008). "Regulation of Nedd4-2 self-ubiquitination and stability by a PY motif located within its HECT-domain." Biochem J **415**(1): 155-163.

Brunet, N., A. Morin and B. Olofsson (2002). "RhoGDI-3 regulates RhoG and targets this protein to the Golgi complex through its unique N-terminal domain." Traffic **3**(5): 342-357.

Budhavarapu, V. N., E. D. White, C. S. Mahanic, L. Chen, F. T. Lin and W. C. Lin (2012). "Regulation of E2F1 by APC/C Cdh1 via K11 linkage-specific ubiquitin chain formation." Cell Cycle **11**(10): 2030-2038.

Burridge, K. and K. Wennerberg (2004). "Rho and Rac take center stage." Cell **116**(2): 167-179.

Caceres, M., J. Guerrero and J. Martinez (2005). "Overexpression of RhoA-GTP induces activation of the Epidermal Growth Factor Receptor, dephosphorylation of focal adhesion kinase and increased motility in breast cancer cells." Exp Cell Res **309**(1): 229-238.

Cadwell, K. and L. Coscoy (2005). "Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase." Science **309**(5731): 127-130.

- Cao, J. and Q. Yan (2012). "Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer." Front Oncol **2**: 26.
- Cerione, R. A. and Y. Zheng (1996). "The Dbl family of oncogenes." Curr Opin Cell Biol **8**(2): 216-222.
- Chaudhary, N. and S. Maddika (2014). "WWP2-WWP1 ubiquitin ligase complex coordinated by PPM1G maintains the balance between cellular p73 and DeltaNp73 levels." Mol Cell Biol **34**(19): 3754-3764.
- Chen, C. and L. E. Matesic (2007). "The Nedd4-like family of E3 ubiquitin ligases and cancer." Cancer Metastasis Rev **26**(3-4): 587-604.
- Chen, C., X. Sun, P. Guo, X. Y. Dong, P. Sethi, X. Cheng, J. Zhou, J. Ling, J. W. Simons, J. B. Lingrel and J. T. Dong (2005). "Human Kruppel-like factor 5 is a target of the E3 ubiquitin ligase WWP1 for proteolysis in epithelial cells." J Biol Chem **280**(50): 41553-41561.
- Chen, C., X. Sun, P. Guo, X. Y. Dong, P. Sethi, W. Zhou, Z. Zhou, J. Petros, H. F. Frierson, Jr., R. L. Vessella, A. Atfi and J. T. Dong (2007). "Ubiquitin E3 ligase WWP1 as an oncogenic factor in human prostate cancer." Oncogene **26**(16): 2386-2394.
- Chen, C., Z. Zhou, R. Liu, Y. Li, P. B. Azmi and A. K. Seth (2008). "The WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 upregulates ErbB2 and EGFR through RING finger protein 11." Oncogene **27**(54): 6845-6855.
- Chen, C., Z. Zhou, J. S. Ross, W. Zhou and J. T. Dong (2007). "The amplified WWP1 gene is a potential molecular target in breast cancer." Int J Cancer **121**(1): 80-87.
- Chen, C., Z. Zhou, C. E. Sheehan, E. Slodkowska, C. B. Sheehan, A. Boguniewicz and J. S. Ross (2009). "Overexpression of WWP1 is associated with the estrogen receptor and insulin-like growth factor receptor 1 in breast carcinoma." Int J Cancer **124**(12): 2829-2836.
- Chen, Y., Z. Yang, M. Meng, Y. Zhao, N. Dong, H. Yan, L. Liu, M. Ding, H. B. Peng and F. Shao (2009). "Cullin mediates degradation of RhoA through evolutionarily conserved BTB adaptors to control actin cytoskeleton structure and cell movement." Mol Cell **35**(6): 841-855.
- Chen, Y. G., A. Hata, R. S. Lo, D. Wotton, Y. Shi, N. Pavletich and J. Massague (1998). "Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction." Genes Dev **12**(14): 2144-2152.
- Chen, Y. G., F. Liu and J. Massague (1997). "Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12." EMBO J **16**(13): 3866-3876.
- Ching, Y. P., C. M. Wong, S. F. Chan, T. H. Leung, D. C. Ng, D. Y. Jin and I. O. Ng (2003). "Deleted in liver cancer (DLC) 2 encodes a RhoGAP protein with growth suppressor function and is underexpressed in hepatocellular carcinoma." J Biol Chem **278**(12): 10824-10830.
- Chircop, M. (2014). "Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells." Small GTPases **5**.
- Ciechanover, A. (2005). "Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 79-87.

- Conkright, M. D., M. A. Wani and J. B. Lingrel (2001). "Lung Kruppel-like factor contains an autoinhibitory domain that regulates its transcriptional activation by binding WWP1, an E3 ubiquitin ligase." *J Biol Chem* **276**(31): 29299-29306.
- Connolly, E. C., J. Freimuth and R. J. Akhurst (2012). "Complexities of TGF-beta targeted cancer therapy." *Int J Biol Sci* **8**(7): 964-978.
- Corbalan-Garcia, S. and J. C. Gomez-Fernandez (2014). "Signaling through C2 domains: more than one lipid target." *Biochim Biophys Acta* **1838**(6): 1536-1547.
- Crepaldi, T., A. Gautreau, P. M. Comoglio, D. Louvard and M. Arpin (1997). "Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells." *J Cell Biol* **138**(2): 423-434.
- Cui, W., D. J. Fowles, S. Bryson, E. Duffie, H. Ireland, A. Balmain and R. J. Akhurst (1996). "TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice." *Cell* **86**(4): 531-542.
- Dennler, S., S. Itoh, D. Vivien, P. ten Dijke, S. Huet and J. M. Gauthier (1998). "Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene." *Embo J* **17**(11): 3091-3100.
- Dennler, S., C. Prunier, N. Ferrand, J. M. Gauthier and A. Atfi (2000). "c-Jun inhibits transforming growth factor beta-mediated transcription by repressing Smad3 transcriptional activity." *J Biol Chem* **275**(37): 28858-28865.
- Denoyelle, C., M. Vasse, M. Korner, Z. Mishal, F. Ganne, J. P. Vannier, J. Soria and C. Soria (2001). "Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study." *Carcinogenesis* **22**(8): 1139-1148.
- DerMardirossian, C., A. Schnelzer and G. M. Bokoch (2004). "Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase." *Mol Cell* **15**(1): 117-127.
- Derynck, R., R. J. Akhurst and A. Balmain (2001). "TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression." *Nat Genet* **29**(2): 117-129.
- Deveraux, Q., V. Ustrell, C. Pickart and M. Rechsteiner (1994). "A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates." *J Biol Chem* **269**(10): 7059-7061.
- Dou, Q. P. and J. A. Zonder (2014). "Overview of proteasome inhibitor-based anti-cancer therapies: perspective on bortezomib and second generation proteasome inhibitors versus future generation inhibitors of ubiquitin-proteasome system." *Curr Cancer Drug Targets* **14**(6): 517-536.
- Dovas, A. and J. R. Couchman (2005). "RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities." *Biochem J* **390**(Pt 1): 1-9.
- Drabsch, Y. and P. ten Dijke (2012). "TGF-beta signalling and its role in cancer progression and metastasis." *Cancer Metastasis Rev* **31**(3-4): 553-568.



Dransart, E., B. Olofsson and J. Cherfils (2005). "RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation." Traffic **6**(11): 957-966.

Dumont, E., F. Lallemand, C. Prunier, N. Ferrand, A. Guillozo, B. Clement, A. Atfi and N. Theret (2003). "Evidence for a role of Smad3 and Smad2 in stabilization of the tumor-derived mutant Smad2.Q407R." J Biol Chem **278**(27): 24881-24887.

Duncan, L. M., S. Piper, R. B. Dodd, M. K. Saville, C. M. Sanderson, J. P. Luzio and P. J. Lehner (2006). "Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules." Embo J **25**(8): 1635-1645.

Dupont, S., A. Mamidi, M. Cordenonsi, M. Montagner, L. Zacchigna, M. Adorno, G. Martello, M. J. Stinchfield, S. Soligo, L. Morsut, M. Inui, S. Moro, N. Modena, F. Argenton, S. J. Newfeld and S. Piccolo (2009). "FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination." Cell **136**(1): 123-135.

Durkin, M. E., V. Ullmannova, M. Guan and N. C. Popescu (2007). "Deleted in liver cancer 3 (DLC-3), a novel Rho GTPase-activating protein, is downregulated in cancer and inhibits tumor cell growth." Oncogene **26**(31): 4580-4589.

Ebisawa, T., M. Fukuchi, G. Murakami, T. Chiba, K. Tanaka, T. Imamura and K. Miyazono (2001). "Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation." J Biol Chem **276**(16): 12477-12480.

El-Sitt, S., B. D. Khalil, S. Hanna, M. El-Sabban, N. Fakhreddine and M. El-Sibai (2012). "DLC2/StarD13 plays a role of a tumor suppressor in astrocytoma." Oncol Rep **28**(2): 511-518.

Elsasser, S., R. R. Gali, M. Schwickart, C. N. Larsen, D. S. Leggett, B. Muller, M. T. Feng, F. Tubing, G. A. Dittmar and D. Finley (2002). "Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains." Nat Cell Biol **4**(9): 725-730.

Engel, M. E., M. A. McDonnell, B. K. Law and H. L. Moses (1999). "Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription." J Biol Chem **274**(52): 37413-37420.

Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-635.

Feng, S. M., R. S. Muraoka-Cook, D. Hunter, M. A. Sandahl, L. S. Caskey, K. Miyazawa, A. Atfi and H. S. Earp, 3rd (2009). "The E3 ubiquitin ligase WWP1 selectively targets HER4 and its proteolytically derived signaling isoforms for degradation." Mol Cell Biol **29**(3): 892-906.

Feng, X. H., Y. Zhang, R. Y. Wu and R. Derynck (1998). "The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation." Genes Dev **12**(14): 2153-2163.

Ferrand, N., A. Atfi and C. Prunier (2010). "The Oncoprotein c-Ski Functions as a Direct Antagonist of the Transforming Growth Factor- $\beta$  Type I Receptor." Cancer Res.

Flasza, M., P. Gorman, R. Roylance, A. E. Canfield and M. Baron (2002). "Alternative splicing determines the domain structure of WWP1, a Nedd4 family protein." Biochem Biophys Res Commun **290**(1): 431-437.

Flasza, M., N. S. Nguyen Huu, S. Mazaleyrat, S. Clemence, C. Villemant, R. Clarke and M. Baron (2006). "Regulation of the nuclear localization of the human Nedd4-related WWP1 protein by Notch." Mol Membr Biol **23**(3): 269-276.

Fritz, G., C. Brachetti, F. Bahlmann, M. Schmidt and B. Kaina (2002). "Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters." Br J Cancer **87**(6): 635-644.

Fritz, G., I. Just and B. Kaina (1999). "Rho GTPases are over-expressed in human tumors." Int J Cancer **81**(5): 682-687.

Fukumoto, Y., K. Kaibuchi, Y. Hori, H. Fujioka, S. Araki, T. Ueda, A. Kikuchi and Y. Takai (1990). "Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins." Oncogene **5**(9): 1321-1328.

Gallagher, E., M. Gao, Y. C. Liu and M. Karin (2006). "Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(6): 1717-1722.

Gao, K., X. Li, G. Hu, K. Yang, B. Tian and Y. Zhang (2012). "Expression of deleted in liver cancer 2 in colorectal cancer and its correlation with clinicopathological parameters." Oncol Lett **4**(5): 988-992.

Gao, M., T. Labuda, Y. Xia, E. Gallagher, D. Fang, Y. C. Liu and M. Karin (2004). "Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch." Science **306**(5694): 271-275.

Garcia-Mata, R., E. Boulter and K. Burridge (2011). "The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(8): 493-504.

Goicoechea, S. M., S. Awadia and R. Garcia-Mata (2014). "I'm coming to GEF you: Regulation of RhoGEFs during cell migration." Cell Adh Migr **8**(6): 535-549.

Haas, T. L., C. H. Emmerich, B. Gerlach, A. C. Schmukle, S. M. Cordier, E. Rieser, R. Feltham, J. Vince, U. Warnken, T. Wenger, R. Koschny, D. Komander, J. Silke and H. Walczak (2009). "Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction." Mol Cell **36**(5): 831-844.

Haglund, K., S. Sigismund, S. Polo, I. Szymkiewicz, P. P. Di Fiore and I. Dikic (2003). "Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation." Nat Cell Biol **5**(5): 461-466.

Hahn, S. A., M. Schutte, A. T. Hoque, C. A. Moskaluk, L. T. da Costa, E. Rozenblum, C. L. Weinstein, A. Fischer, C. J. Yeo, R. H. Hruban and S. E. Kern (1996). "DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1." Science **271**(5247): 350-353.

Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." Science **279**(5350): 509-514.

Hanafusa, H., J. Ninomiya-Tsuji, N. Masuyama, M. Nishita, J. Fujisawa, H. Shibuya, K. Matsumoto and E. Nishida (1999). "Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression." J Biol Chem **274**(38): 27161-27167.

Hanna, S., B. Khalil, A. Nasrallah, B. A. Saykali, R. Sobh, S. Nasser and M. El-Sibai (2014). "StarD13 is a tumor suppressor in breast cancer that regulates cell motility and invasion." Int J Oncol **44**(5): 1499-1511.

Hart, M. J., A. Eva, T. Evans, S. A. Aaronson and R. A. Cerione (1991). "Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product." Nature **354**(6351): 311-314.

Hayashi, H., S. Abdollah, Y. Qiu, J. Cai, Y. Y. Xu, B. W. Grinnell, M. A. Richardson, J. N. Topper, M. A. Gimbrone, Jr., J. L. Wrana and D. Falb (1997). "The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling." Cell **89**(7): 1165-1173.

Heidecker, G., P. A. Lloyd, F. Soheilian, K. Nagashima and D. Derse (2007). "The role of WWP1-Gag interaction and Gag ubiquitination in assembly and release of human T-cell leukemia virus type 1." J Virol **81**(18): 9769-9777.

Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-479.

Hibbert, R. G., A. Huang, R. Boelens and T. K. Sixma (2011). "E3 ligase Rad18 promotes monoubiquitination rather than ubiquitin chain formation by E2 enzyme Rad6." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(14): 5590-5595.

Hochstrasser, M. (2000). "Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems." Nat Cell Biol **2**(8): E153-157.

Hu, K. Q. and J. Settleman (1997). "Tandem SH2 binding sites mediate the RasGAP-RhoGAP interaction: a conformational mechanism for SH3 domain regulation." Embo J **16**(3): 473-483.

Hua, X., Z. A. Miller, H. Benchabane, J. L. Wrana and H. F. Lodish (2000). "Synergism between transcription factors TFE3 and Smad3 in transforming growth factor-beta-induced transcription of the Smad7 gene." J Biol Chem **275**(43): 33205-33208.

Huang, F., D. Kirkpatrick, X. Jiang, S. Gygi and A. Sorkin (2006). "Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain." Mol Cell **21**(6): 737-748.

Ihara, K., S. Muraguchi, M. Kato, T. Shimizu, M. Shirakawa, S. Kuroda, K. Kaibuchi and T. Hakoshima (1998). "Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue." J Biol Chem **273**(16): 9656-9666.

Imamura, T., A. Hikita and Y. Inoue (2012). "The roles of TGF-beta signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis." Breast Cancer **19**(2): 118-124.

- Ingham, R. J., K. Colwill, C. Howard, S. Dettwiler, C. S. Lim, J. Yu, K. Hersi, J. Raaijmakers, G. Gish, G. Mbamalu, L. Taylor, B. Yeung, G. Vassilovski, M. Amin, F. Chen, L. Matskova, G. Winberg, I. Ernberg, R. Linding, P. O'Donnell, A. Starostine, W. Keller, P. Metalnikov, C. Stark and T. Pawson (2005). "WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks." Mol Cell Biol **25**(16): 7092-7106.
- Inobe, T. and A. Matouschek (2014). "Paradigms of protein degradation by the proteasome." Curr Opin Struct Biol **24C**: 156-164.
- Inoue, Y. and T. Imamura (2008). "Regulation of TGF-beta family signaling by E3 ubiquitin ligases." Cancer Sci **99**(11): 2107-2112.
- Inui, M., A. Manfrin, A. Mamidi, G. Martello, L. Morsut, S. Soligo, E. Enzo, S. Moro, S. Polo, S. Dupont, M. Cordenonsi and S. Piccolo (2011). "USP15 is a deubiquitylating enzyme for receptor-activated SMADs." Nat Cell Biol **13**(11): 1368-1375.
- Ito, Y. and K. Miyazono (2003). "RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling." Curr Opin Genet Dev **13**(1): 43-47.
- Ivetic, A. and A. J. Ridley (2004). "Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes." Immunology **112**(2): 165-176.
- Izumoto, S., N. Arita, T. Ohnishi, S. Hiraga, T. Taki, N. Tomita, M. Ohue and T. Hayakawa (1997). "Microsatellite instability and mutated type II transforming growth factor-beta receptor gene in gliomas." Cancer Lett **112**(2): 251-256.
- Jaffe, A. B. and A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 247-269.
- Janknecht, R., N. J. Wells and T. Hunter (1998). "TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300." Genes Dev **12**(14): 2114-2119.
- Jiang, W., M. Betson, R. Mulloy, R. Foster, M. Levay, E. Ligeti and J. Settleman (2008). "p190A RhoGAP is a glycogen synthase kinase-3-beta substrate required for polarized cell migration." J Biol Chem **283**(30): 20978-20988.
- Jin, L., A. Williamson, S. Banerjee, I. Philipp and M. Rape (2008). "Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex." Cell **133**(4): 653-665.
- Jones, D. C., M. N. Wein, M. Oukka, J. G. Hofstaetter, M. J. Glimcher and L. H. Glimcher (2006). "Regulation of adult bone mass by the zinc finger adapter protein Schnurri-3." Science **312**(5777): 1223-1227.
- Jordan, P., R. Brazao, M. G. Boavida, C. Gespach and E. Chastre (1999). "Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors." Oncogene **18**(48): 6835-6839.
- Kang, Y., P. M. Siegel, W. Shu, M. Drobnjak, S. M. Kakonen, C. Cordon-Cardo, T. A. Guise and J. Massague (2003). "A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone." Cancer Cell **3**(6): 537-549.

Karlsson, R., E. D. Pedersen, Z. Wang and C. Brakebusch (2009). "Rho GTPase function in tumorigenesis." Biochim Biophys Acta **1796**(2): 91-98.

Katsuno, Y., S. Lamouille and R. Derynck (2013). "TGF-beta signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression." Curr Opin Oncol **25**(1): 76-84.

Kavsak, P., R. K. Rasmussen, C. G. Causing, S. Bonni, H. Zhu, G. H. Thomsen and J. L. Wrana (2000). "Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation." Mol Cell **6**(6): 1365-1375.

Kawai, K., J. Seike, T. Iino, M. Kiyota, Y. Iwamae, H. Nishitani and H. Yagisawa (2009). "START-GAP2/DLC2 is localized in focal adhesions via its N-terminal region." Biochem Biophys Res Commun **380**(4): 736-741.

Kawakami, T., T. Chiba, T. Suzuki, K. Iwai, K. Yamanaka, N. Minato, H. Suzuki, N. Shimbara, Y. Hidaka, F. Osaka, M. Omata and K. Tanaka (2001). "NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase." Embo J **20**(15): 4003-4012.

Kerscher, O., R. Felberbaum and M. Hochstrasser (2006). "Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 159-180.

Kim, T. Y., S. Jackson, Y. Xiong, T. G. Whitsett, J. R. Lobello, G. J. Weiss, N. L. Tran, Y. J. Bang and C. J. Der (2013). "CRL4A-FBXW5-mediated degradation of DLC1 Rho GTPase-activating protein tumor suppressor promotes non-small cell lung cancer cell growth." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(42): 16868-16873.

Kiyono, K., H. I. Suzuki, H. Matsuyama, Y. Morishita, A. Komuro, M. R. Kano, K. Sugimoto and K. Miyazono (2009). "Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells." Cancer Res **69**(23): 8844-8852.

Ko, F. C., L. K. Chan, E. K. Tung, S. W. Lowe, I. O. Ng and J. W. Yam (2010). "Akt phosphorylation of deleted in liver cancer 1 abrogates its suppression of liver cancer tumorigenesis and metastasis." Gastroenterology **139**(4): 1397-1407.

Koinuma, D., M. Shinozaki, A. Komuro, K. Goto, M. Saitoh, A. Hanyu, M. Ebina, T. Nukiwa, K. Miyazawa, T. Imamura and K. Miyazono (2003). "Arkadia amplifies TGF-beta superfamily signalling through degradation of Smad7." EMBO J **22**(24): 6458-6470.

Komander, D., M. J. Clague and S. Urbe (2009). "Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(8): 550-563.

Komuro, A., T. Imamura, M. Saitoh, Y. Yoshida, T. Yamori, K. Miyazono and K. Miyazawa (2004). "Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1)." Oncogene **23**(41): 6914-6923.

Kretschmar, M., J. Doody, I. Timokhina and J. Massague (1999). "A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras." Genes Dev **13**(7): 804-816.

Krugmann, S., R. Williams, L. Stephens and P. T. Hawkins (2004). "ARAP3 is a PI3K- and rap-regulated GAP for RhoA." Curr Biol **14**(15): 1380-1384.

- Kulkarni, A. B. and S. Karlsson (1993). "Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease." Am J Pathol **143**(1): 3-9.
- Kumar, D. and A. B. Lassar (2009). "The transcriptional activity of Sox9 in chondrocytes is regulated by RhoA signaling and actin polymerization." Mol Cell Biol **29**(15): 4262-4273.
- Laine, A. and Z. Ronai (2007). "Regulation of p53 localization and transcription by the HECT domain E3 ligase WWP1." Oncogene **26**(10): 1477-1483.
- Lallemand, F., S. R. Seo, N. Ferrand, M. Pessah, S. L'Hoste, G. Rawadi, S. Roman-Roman, J. Camonis and A. Atfi (2005). "AIP4 restricts transforming growth factor-beta signaling through a ubiquitination-independent mechanism." J Biol Chem **280**(30): 27645-27653.
- Landre, V., B. Rotblat, S. Melino, F. Bernassola and G. Melino (2014). "Screening for E3-ubiquitin ligase inhibitors: challenges and opportunities." Oncotarget **5**(18): 7988-8013.
- Lang, P., F. Gesbert, M. Delespine-Carmagnat, R. Stancou, M. Pouchelet and J. Bertoglio (1996). "Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes." Embo J **15**(3): 510-519.
- Leonard, D., M. J. Hart, J. V. Platko, A. Eva, W. Henzel, T. Evans and R. A. Cerione (1992). "The identification and characterization of a GDP-dissociation inhibitor (GDI) for the CDC42Hs protein." J Biol Chem **267**(32): 22860-22868.
- Leung, T. H., Y. P. Ching, J. W. Yam, C. M. Wong, T. O. Yau, D. Y. Jin and I. O. Ng (2005). "Deleted in liver cancer 2 (DLC2) suppresses cell transformation by means of inhibition of RhoA activity." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(42): 15207-15212.
- Leung, T. H., J. W. Yam, L. K. Chan, Y. P. Ching and I. O. Ng (2010). "Deleted in liver cancer 2 suppresses cell growth via the regulation of the Raf-1-ERK1/2-p70S6K signalling pathway." Liver Int **30**(9): 1315-1323.
- Levy, M., J. Settleman and E. Ligeti (2009). "Regulation of the substrate preference of p190RhoGAP by protein kinase C-mediated phosphorylation of a phospholipid binding site." Biochemistry **48**(36): 8615-8623.
- Levy, L., M. Howell, D. Das, S. Harkin, V. Episkopou and C. S. Hill (2007). "Arkadia activates Smad3/Smad4-dependent transcription by triggering signal-induced SnoN degradation." Mol Cell Biol **27**(17): 6068-6083.
- Li, Y., Z. Zhou, M. Alimandi and C. Chen (2009). "WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 targets the full-length ErbB4 for ubiquitin-mediated degradation in breast cancer." Oncogene **28**(33): 2948-2958.
- Li, Y., Z. Zhou and C. Chen (2008). "WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1 targets p63 transcription factor for ubiquitin-mediated proteasomal degradation and regulates apoptosis." Cell Death Differ **15**(12): 1941-1951.
- Liao, Y. C. and S. H. Lo (2008). "Deleted in liver cancer-1 (DLC-1): a tumor suppressor not just for liver." Int J Biochem Cell Biol **40**(5): 843-847.

- Liao, Y. C., L. Si, R. W. deVere White and S. H. Lo (2007). "The phosphotyrosine-independent interaction of DLC-1 and the SH2 domain of cten regulates focal adhesion localization and growth suppression activity of DLC-1." J Cell Biol **176**(1): 43-49.
- Lin, X., X. Duan, Y. Y. Liang, Y. Su, K. H. Wrighton, J. Long, M. Hu, C. M. Davis, J. Wang, F. C. Brunicardi, Y. Shi, Y. G. Chen, A. Meng and X. H. Feng (2006). "PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling." Cell **125**(5): 915-928.
- Lin, X., M. Liang and X. H. Feng (2000). "Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling." J Biol Chem **275**(47): 36818-36822.
- Lin, Y., N. T. Chen, Y. P. Shih, Y. C. Liao, L. Xue and S. H. Lo (2010). "DLC2 modulates angiogenic responses in vascular endothelial cells by regulating cell attachment and migration." Oncogene **29**(20): 3010-3016.
- Liu, T. and X. H. Feng (2010). "Regulation of TGF-beta signalling by protein phosphatases." Biochem J **430**(2): 191-198.
- Lu, K., P. Li, M. Zhang, G. Xing, X. Li, W. Zhou, M. Bartlam, L. Zhang, Z. Rao and F. He (2011). "Pivotal role of the C2 domain of the Smurf1 ubiquitin ligase in substrate selection." J Biol Chem **286**(19): 16861-16870.
- Lu, K., X. Yin, T. Weng, S. Xi, L. Li, G. Xing, X. Cheng, X. Yang, L. Zhang and F. He (2008). "Targeting WW domains linker of HECT-type ubiquitin ligase Smurf1 for activation by CKIP-1." Nat Cell Biol **10**(8): 994-1002.
- Lucke, C. D., A. Philpott, J. C. Metcalfe, A. M. Thompson, L. Hughes-Davies, P. R. Kemp and R. Hesketh (2001). "Inhibiting mutations in the transforming growth factor beta type 2 receptor in recurrent human breast cancer." Cancer Res **61**(2): 482-485.
- Lukasik, D., E. Wilczek, A. Wasiutynski and B. Gornicka (2011). "Deleted in liver cancer protein family in human malignancies (Review)." Oncol Lett **2**(5): 763-768.
- Luo, K., S. L. Stroschein, W. Wang, D. Chen, E. Martens, S. Zhou and Q. Zhou (1999). "The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling." Genes Dev **13**(17): 2196-2206.
- Macias-Silva, M., S. Abdollah, P. A. Hoodless, R. Pirone, L. Attisano and J. L. Wrana (1996). "MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling." Cell **87**(7): 1215-1224.
- Madaule, P. and R. Axel (1985). "A novel ras-related gene family." Cell **41**(1): 31-40.
- Markowitz, S., J. Wang, L. Myeroff, R. Parsons, L. Sun, J. Lutterbaugh, R. S. Fan, E. Zborowska, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and et al. (1995). "Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability." Science **268**(5215): 1336-1338.
- Massague, J. (1998). "TGF-beta signal transduction." Annu Rev Biochem **67**: 753-791.
- Massague, J. (2008). "TGFbeta in Cancer." Cell **134**(2): 215-230.

- Mayor, R. and C. Carmona-Fontaine (2010). "Keeping in touch with contact inhibition of locomotion." Trends Cell Biol **20**(6): 319-328.
- Meerang, M., D. Ritz, S. Paliwal, Z. Garajova, M. Bosshard, N. Mailand, P. Janscak, U. Hubscher, H. Meyer and K. Ramadan (2011). "The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks." Nat Cell Biol **13**(11): 1376-1382.
- Meller, N., S. Merlot and C. Guda (2005). "CZH proteins: a new family of Rho-GEFs." J Cell Sci **118**(Pt 21): 4937-4946.
- Mettouchi, A. and E. Lemichez (2012). "Ubiquitylation of active Rac1 by the E3 ubiquitin-ligase HACE1." Small GTPases **3**(2): 102-106.
- Minoshima, Y., T. Kawashima, K. Hirose, Y. Tono-zuka, A. Kawajiri, Y. C. Bao, X. Deng, M. Tatsuka, S. Narumiya, W. S. May, Jr., T. Nosaka, K. Semba, T. Inoue, T. Satoh, M. Inagaki and T. Kitamura (2003). "Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis." Dev Cell **4**(4): 549-560.
- Miralles, F., G. Posern, A. I. Zaromytidou and R. Treisman (2003). "Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL." Cell **113**(3): 329-342.
- Miyaki, M. and T. Kuroki (2003). "Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer." Biochem Biophys Res Commun **306**(4): 799-804.
- Miyazono, K. and K. Miyazawa (2002). "Id: a target of BMP signaling." Sci STKE **2002**(151): pe40.
- Momand, J., G. P. Zambetti, D. C. Olson, D. George and A. J. Levine (1992). "The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation." Cell **69**(7): 1237-1245.
- Moren, A., T. Imamura, K. Miyazono, C. H. Heldin and A. Moustakas (2005). "Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT domain ubiquitin ligases." J Biol Chem **280**(23): 22115-22123.
- Mund, T., M. J. Lewis, S. Maslen and H. R. Pelham (2014). "Peptide and small molecule inhibitors of HECT-type ubiquitin ligases." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(47): 16736-16741.
- Mund, T. and H. R. Pelham (2009). "Control of the activity of WW-HECT domain E3 ubiquitin ligases by NDFIP proteins." EMBO Rep **10**(5): 501-507.
- Myeroff, L. L., R. Parsons, S. J. Kim, L. Hedrick, K. R. Cho, K. Orth, M. Mathis, K. W. Kinzler, J. Lutterbaugh, K. Park and et al. (1995). "A transforming growth factor beta receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability." Cancer Res **55**(23): 5545-5547.
- Nagaraja, G. M. and R. P. Kandpal (2004). "Chromosome 13q12 encoded Rho GTPase activating protein suppresses growth of breast carcinoma cells, and yeast two-hybrid screen shows its interaction with several proteins." Biochem Biophys Res Commun **313**(3): 654-665.
- Narumiya, S., M. Tanji and T. Ishizaki (2009). "Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion." Cancer Metastasis Rev **28**(1-2): 65-76.



- Nasrallah, A., B. Saykali, S. Al Dimassi, N. Khoury, S. Hanna and M. El-Sibai (2014). "Effect of StarD13 on colorectal cancer proliferation, motility and invasion." Oncol Rep **31**(1): 505-515.
- Ng, D. C., S. F. Chan, K. H. Kok, J. W. Yam, Y. P. Ching, I. O. Ng and D. Y. Jin (2006). "Mitochondrial targeting of growth suppressor protein DLC2 through the START domain." FEBS Lett **580**(1): 191-198.
- Nguyen Huu, N. S., W. D. Ryder, N. Zeps, M. Flasz, M. Chiu, A. M. Hanby, R. Poulson, R. B. Clarke and M. Baron (2008). "Tumour-promoting activity of altered WWP1 expression in breast cancer and its utility as a prognostic indicator." J Pathol **216**(1): 93-102.
- Nie, J., L. Liu, G. Xing, M. Zhang, R. Wei, M. Guo, X. Li, P. Xie, L. Li, F. He, W. Han and L. Zhang (2014). "CKIP-1 acts as a colonic tumor suppressor by repressing oncogenic Smurf1 synthesis and promoting Smurf1 autodegradation." Oncogene **33**(28): 3677-3687.
- O'Connor, K. and M. Chen (2013). "Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion." Small GTPases **4**(3): 141-147.
- Oberoi, T. K., T. Dogan, J. C. Hocking, R. P. Scholz, J. Mooz, C. L. Anderson, C. Karreman, D. Meyer zu Heringdorf, G. Schmidt, M. Ruonala, K. Namikawa, G. S. Harms, A. Carpy, B. Macek, R. W. Koster and K. Rajalingam (2012). "IAPs regulate the plasticity of cell migration by directly targeting Rac1 for degradation." EMBO J **31**(1): 14-28.
- Ogunjimi, A. A., D. J. Briant, N. Pece-Barbara, C. Le Roy, G. M. Di Guglielmo, P. Kavsak, R. K. Rasmussen, B. T. Seet, F. Sicheri and J. L. Wrana (2005). "Regulation of Smurf2 ubiquitin ligase activity by anchoring the E2 to the HECT domain." Mol Cell **19**(3): 297-308.
- Olofsson, B. (1999). "Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling." Cell Signal **11**(8): 545-554.
- Ozdamar, B., R. Bose, M. Barrios-Rodiles, H. R. Wang, Y. Zhang and J. L. Wrana (2005). "Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity." Science **307**(5715): 1603-1609.
- Ozkan, E., H. Yu and J. Deisenhofer (2005). "Mechanistic insight into the allosteric activation of a ubiquitin-conjugating enzyme by RING-type ubiquitin ligases." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 18890-18895.
- Passmore, L. A. and D. Barford (2004). "Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation." Biochem J **379**(Pt 3): 513-525.
- Peschiarioli, A., F. Scialpi, F. Bernassola, S. El Sherbini el and G. Melino (2010). "The E3 ubiquitin ligase WWP1 regulates DeltaNp63-dependent transcription through Lys63 linkages." Biochem Biophys Res Commun **402**(2): 425-430.
- Pessah, M., C. Prunier, J. Marais, N. Ferrand, A. Mazars, F. Lallemand, J. M. Gauthier and A. Atfi (2001). "c-Jun interacts with the corepressor TG-interacting factor (TGIF) to suppress Smad2 transcriptional activity." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6198-6203.
- Petroski, M. D. and R. J. Deshaies (2005). "Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 9-20.

Petzold, K. M., H. Naumann and F. M. Spagnoli (2013). "Rho signalling restriction by the RhoGAP Stard13 integrates growth and morphogenesis in the pancreas." Development **140**(1): 126-135.

Pickart, C. M. (1997). "Targeting of substrates to the 26S proteasome." FASEB J **11**(13): 1055-1066.

Pille, J. Y., C. Denoyelle, J. Varet, J. R. Bertrand, J. Soria, P. Opolon, H. Lu, L. L. Pritchard, J. P. Vannier, C. Malvy, C. Soria and H. Li (2005). "Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo." Mol Ther **11**(2): 267-274.

Pirozzi, G., S. J. McConnell, A. J. Uveges, J. M. Carter, A. B. Sparks, B. K. Kay and D. M. Fowlkes (1997). "Identification of novel human WW domain-containing proteins by cloning of ligand targets." J Biol Chem **272**(23): 14611-14616.

Plant, P. J., F. Lafont, S. Lecat, P. Verkade, K. Simons and D. Rotin (2000). "Apical membrane targeting of Nedd4 is mediated by an association of its C2 domain with annexin XIIIb." J Cell Biol **149**(7): 1473-1484.

Pouponnot, C., L. Jayaraman and J. Massague (1998). "Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP." J Biol Chem **273**(36): 22865-22868.

Qin, H., H. X. Pu, M. Li, S. Ahmed and J. Song (2008). "Identification and structural mechanism for a novel interaction between a ubiquitin ligase WWP1 and Nogo-A, a key inhibitor for central nervous system regeneration." Biochemistry **47**(51): 13647-13658.

Rittinger, K., P. A. Walker, J. F. Eccleston, K. Nurmahomed, D. Owen, E. Laue, S. J. Gamblin and S. J. Smerdon (1997). "Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP." Nature **388**(6643): 693-697.

Roberts, P. J., N. Mitin, P. J. Keller, E. J. Chenette, J. P. Madigan, R. O. Currin, A. D. Cox, O. Wilson, P. Kirschmeier and C. J. Der (2008). "Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification." J Biol Chem **283**(37): 25150-25163.

Rolli-Derkinderen, M., V. Sauzeau, L. Boyer, E. Lemichez, C. Baron, D. Henrion, G. Loirand and P. Pacaud (2005). "Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells." Circ Res **96**(11): 1152-1160.

Rossman, K. L. and S. L. Campbell (2000). "Bacterial expressed DH and DH/PH domains." Methods Enzymol **325**: 25-38.

Rotin, D. and S. Kumar (2009). "Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(6): 398-409.

Sabbatini, M. E. and J. A. Williams (2013). "Cholecystokinin-mediated RhoGDI phosphorylation via PKCalpha promotes both RhoA and Rac1 signaling." PLoS One **8**(6): e66029.

Sadok, A., A. McCarthy, J. Caldwell, I. Collins, M. D. Garrett, M. Yeo, S. Hooper, E. Sahai, S. Kuemper, F. K. Mardakheh and C. J. Marshall (2015). "Rho kinase inhibitors block melanoma cell migration and inhibit metastasis." Cancer Res **75**(11): 2272-2284.

Sadowski, M., R. Suryadinata, A. R. Tan, S. N. Roesley and B. Sarcevic (2012). "Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes." IUBMB Life **64**(2): 136-142.

Sahai, E. and C. J. Marshall (2003). "Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis." Nat Cell Biol **5**(8): 711-719.

Sauzeau, V., H. Le Jeune, C. Cario-Toumaniantz, A. Smolenski, S. M. Lohmann, J. Bertoglio, P. Chardin, P. Pacaud and G. Loirand (2000). "Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle." J Biol Chem **275**(28): 21722-21729.

Seo, S. R., N. Ferrand, N. Faresse, C. Prunier, L. Abecassis, M. Pessah, M. F. Bourgeade and A. Atfi (2006). "Nuclear retention of the tumor suppressor cPML by the homeodomain protein TGIF restricts TGF-beta signaling." Mol Cell **23**(4): 547-559.

Seo, S. R., F. Lallemant, N. Ferrand, M. Pessah, S. L'Hoste, J. Camonis and A. Atfi (2004). "The novel E3 ubiquitin ligase Tiul1 associates with TGIF to target Smad2 for degradation." Embo J **23**(19): 3780-3792.

Shearwin-Whyatt, L., H. E. Dalton, N. Foot and S. Kumar (2006). "Regulation of functional diversity within the Nedd4 family by accessory and adaptor proteins." Bioessays **28**(6): 617-628.

Shen, R., M. Chen, Y. J. Wang, H. Kaneki, L. Xing, J. O'Keefe R and D. Chen (2006). "Smad6 interacts with Runx2 and mediates Smad ubiquitin regulatory factor 1-induced Runx2 degradation." J Biol Chem **281**(6): 3569-3576.

Shi, Y. and J. Massague (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." Cell **113**(6): 685-700.

Shi, Y., Y. F. Wang, L. Jayaraman, H. Yang, J. Massague and N. P. Pavletich (1998). "Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling." Cell **94**(5): 585-594.

Shu, L., H. Zhang, B. F. Boyce and L. Xing (2013). "Ubiquitin E3 ligase Wwp1 negatively regulates osteoblast function by inhibiting osteoblast differentiation and migration." J Bone Miner Res **28**(9): 1925-1935.

Siegel, P. M. and J. Massague (2003). "Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer." Nat Rev Cancer **3**(11): 807-821.

Siepmann, T. J., R. N. Bohnsack, Z. Tokgoz, O. V. Baboshina and A. L. Haas (2003). "Protein interactions within the N-end rule ubiquitin ligation pathway." J Biol Chem **278**(11): 9448-9457.

Soccio, R. E. and J. L. Breslow (2003). "StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism." J Biol Chem **278**(25): 22183-22186.

Stopa, M., D. Anhuf, L. Terstegen, P. Gatsios, A. M. Gressner and S. Dooley (2000). "Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in transforming growth factor beta (TGF-beta)-induced activation of Smad7. THE TGF-beta response element of the promoter requires functional Smad binding element and E-box sequences for transcriptional regulation." J Biol Chem **275**(38): 29308-29317.

Stroschein, S. L., W. Wang, S. Zhou, Q. Zhou and K. Luo (1999). "Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein." Science **286**(5440): 771-774.

Struckhoff, A. P., M. K. Rana, S. S. Kher, M. E. Burow, J. L. Hagan, L. Del Valle and R. A. Worthylake (2013). "PDZ-RhoGEF is essential for CXCR4-driven breast tumor cell motility through spatial regulation of RhoA." J Cell Sci **126**(Pt 19): 4514-4526.

Subik, K., L. Shu, C. Wu, Q. Liang, D. Hicks, B. Boyce, L. Schiffhauer, D. Chen, C. Chen, P. Tang and L. Xing (2012). "The ubiquitin E3 ligase WWP1 decreases CXCL12-mediated MDA231 breast cancer cell migration and bone metastasis." Bone **50**(4): 813-823.

Sudol, M. and T. Hunter (2000). "NeW wrinkles for an old domain." Cell **103**(7): 1001-1004.

Sun, T., J. Guo, H. Shallow, T. Yang, J. Xu, W. Li, C. Hanson, J. G. Wu, X. Li, H. Massaeli and S. Zhang (2011). "The role of monoubiquitination in endocytic degradation of human ether-a-go-go-related gene (hERG) channels under low K<sup>+</sup> conditions." J Biol Chem **286**(8): 6751-6759.

Sun, Y., X. Liu, E. N. Eaton, W. S. Lane, H. F. Lodish and R. A. Weinberg (1999). "Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signaling." Mol Cell **4**(4): 499-509.

Suzuki, C., G. Murakami, M. Fukuchi, T. Shimanuki, Y. Shikauchi, T. Imamura and K. Miyazono (2002). "Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane." J Biol Chem **277**(42): 39919-39925.

Tang, F., R. Zhang, Y. He, M. Zou, L. Guo and T. Xi (2012). "MicroRNA-125b induces metastasis by targeting STARD13 in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells." PLoS One **7**(5): e35435.

Tanno, H. and M. Komada (2013). "The ubiquitin code and its decoding machinery in the endocytic pathway." J Biochem **153**(6): 497-504.

Tcherkezian, J. and N. Lamarche-Vane (2007). "Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins." Biol Cell **99**(2): 67-86.

Tirado-Rodriguez, B., E. Ortega, P. Segura-Medina and S. Huerta-Yepez (2014). "TGF- beta: an important mediator of allergic disease and a molecule with dual activity in cancer development." J Immunol Res **2014**: 318481.

Tsuchiya, N. and H. Nakagama (2010). "MicroRNA, SND1, and alterations in translational regulation in colon carcinogenesis." Mutat Res **693**(1-2): 94-100.

Ullmannova, V. and N. C. Popescu (2006). "Expression profile of the tumor suppressor genes DLC-1 and DLC-2 in solid tumors." *Int J Oncol* **29**(5): 1127-1132.

Ulloa, L., J. Doody and J. Massague (1999). "Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway." *Nature* **397**(6721): 710-713.

Valastyan, S., A. Chang, N. Benaich, F. Reinhardt and R. A. Weinberg (2010). "Concurrent suppression of integrin alpha5, radixin, and RhoA phenocopies the effects of miR-31 on metastasis." *Cancer Res* **70**(12): 5147-5154.

Valdimarsdottir, G., M. J. Goumans, F. Itoh, S. Itoh, C. H. Heldin and P. ten Dijke (2006). "Smad7 and protein phosphatase 1alpha are critical determinants in the duration of TGF-beta/ALK1 signaling in endothelial cells." *BMC Cell Biol* **7**: 16.

Vega, F. M., G. Fruhwirth, T. Ng and A. J. Ridley (2011). "RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets." *J Cell Biol* **193**(4): 655-665.

Vega, F. M. and A. J. Ridley (2008). "Rho GTPases in cancer cell biology." *FEBS Lett* **582**(14): 2093-2101.

Verdecia, M. A., C. A. Joazeiro, N. J. Wells, J. L. Ferrer, M. E. Bowman, T. Hunter and J. P. Noel (2003). "Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase." *Mol Cell* **11**(1): 249-259.

Vitiello, E., J. G. Ferreira, H. Maiato, M. S. Balda and K. Matter (2014). "The tumour suppressor DLC2 ensures mitotic fidelity by coordinating spindle positioning and cell-cell adhesion." *Nat Commun* **5**: 5826.

Walczak, H., K. Iwai and I. Dikic (2012). "Generation and physiological roles of linear ubiquitin chains." *BMC Biol* **10**: 23.

Wan, L., W. Zou, D. Gao, H. Inuzuka, H. Fukushima, A. H. Berg, R. Drapp, S. Shaik, D. Hu, C. Lester, M. Eguren, M. Malumbres, L. H. Glimcher and W. Wei (2011). "Cdh1 regulates osteoblast function through an APC/C-independent modulation of Smurf1." *Mol Cell* **44**(5): 721-733.

Wang, H. R., Y. Zhang, B. Ozdamar, A. A. Ogunjimi, E. Alexandrova, G. H. Thomsen and J. L. Wrana (2003). "Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation." *Science* **302**(5651): 1775-1779.

Wang, J., Q. Peng, Q. Lin, C. Childress, D. Carey and W. Yang (2010). "Calcium activates Nedd4 E3 ubiquitin ligases by releasing the C2 domain-mediated auto-inhibition." *J Biol Chem* **285**(16): 12279-12288.

Wang, Z., J. Wang, X. Li, L. Xing, Y. Ding, P. Shi, Y. Zhang, S. Guo, X. Shu and B. Shan (2014). "Bortezomib prevents oncogenesis and bone metastasis of prostate cancer by inhibiting WWP1, Smurf1 and Smurf2." *Int J Oncol* **45**(4): 1469-1478.

Wei, J., R. K. Mialki, S. Dong, A. Khoo, R. K. Mallampalli, Y. Zhao and J. Zhao (2013). "A new mechanism of RhoA ubiquitination and degradation: roles of SCF(FBXL19) E3 ligase and Erk2." *Biochim Biophys Acta* **1833**(12): 2757-2764.

Wei, Y., Y. Zhang, U. Derewenda, X. Liu, W. Minor, R. K. Nakamoto, A. V. Somlyo, A. P. Somlyo and Z. S. Derewenda (1997). "Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications." *Nat Struct Biol* **4**(9): 699-703.

Welchman, R. L., C. Gordon and R. J. Mayer (2005). "Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(8): 599-609.

Welsh, C. F. (2004). "Rho GTPases as key transducers of proliferative signals in g1 cell cycle regulation." *Breast Cancer Res Treat* **84**(1): 33-42.

Wiborg, O., M. S. Pedersen, A. Wind, L. E. Berglund, K. A. Marcker and J. Vuust (1985). "The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences." *EMBO J* **4**(3): 755-759.

Wiesner, S., A. A. Ogunjimi, H. R. Wang, D. Rotin, F. Sicheri, J. L. Wrana and J. D. Forman-Kay (2007). "Autoinhibition of the HECT-type ubiquitin ligase Smurf2 through its C2 domain." *Cell* **130**(4): 651-662.

Williams, S., C. Pettaway, R. Song, C. Papandreou, C. Logothetis and D. J. McConkey (2003). "Differential effects of the proteasome inhibitor bortezomib on apoptosis and angiogenesis in human prostate tumor xenografts." *Mol Cancer Ther* **2**(9): 835-843.

Wood, J. D., J. Yuan, R. L. Margolis, V. Colomer, K. Duan, J. Kushi, Z. Kaminsky, J. J. Kleiderlein, A. H. Sharp and C. A. Ross (1998). "Atrophin-1, the DRPLA gene product, interacts with two families of WW domain-containing proteins." *Mol Cell Neurosci* **11**(3): 149-160.

Wotton, D., R. S. Lo, L. A. Swaby and J. Massague (1999). "Multiple modes of repression by the Smad transcriptional corepressor TGIF." *J Biol Chem* **274**(52): 37105-37110.

Wu, Y., F. Sato, T. Yamada, U. K. Bhawal, T. Kawamoto, K. Fujimoto, M. Noshiro, H. Seino, S. Morohashi, K. Hakamada, Y. Abiko, Y. Kato and H. Kijima (2012). "The BHLH transcription factor DEC1 plays an important role in the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer." *Int J Oncol* **41**(4): 1337-1346.

Xiaorong, L., W. Wei, Q. Liyuan and Y. Kaiyan (2008). "Underexpression of deleted in liver cancer 2 (DLC2) is associated with overexpression of RhoA and poor prognosis in hepatocellular carcinoma." *BMC Cancer* **8**: 205.

Xie, P., M. Zhang, S. He, K. Lu, Y. Chen, G. Xing, Y. Lu, P. Liu, Y. Li, S. Wang, N. Chai, J. Wu, H. Deng, H. R. Wang, Y. Cao, F. Zhao, Y. Cui, J. Wang, F. He and L. Zhang (2014). "The covalent modifier Nedd8 is critical for the activation of Smurf1 ubiquitin ligase in tumorigenesis." *Nat Commun* **5**: 3733.

Xu, P., D. M. Duong, N. T. Seyfried, D. Cheng, Y. Xie, J. Robert, J. Rush, M. Hochstrasser, D. Finley and J. Peng (2009). "Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation." *Cell* **137**(1): 133-145.

Yagi, K., D. Goto, T. Hamamoto, S. Takenoshita, M. Kato and K. Miyazono (1999). "Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3." J Biol Chem **274**(2): 703-709.

Yamana, N., Y. Arakawa, T. Nishino, K. Kurokawa, M. Tanji, R. E. Itoh, J. Monypenny, T. Ishizaki, H. Bito, K. Nozaki, N. Hashimoto, M. Matsuda and S. Narumiya (2006). "The Rho-mDia1 pathway regulates cell polarity and focal adhesion turnover in migrating cells through mobilizing Apc and c-Src." Mol Cell Biol **26**(18): 6844-6858.

Yan, J. and A. M. Jetten (2008). "RAP80 and RNF8, key players in the recruitment of repair proteins to DNA damage sites." Cancer Lett **271**(2): 179-190.

Yang, C., W. Zhou, M. S. Jeon, D. Demydenko, Y. Harada, H. Zhou and Y. C. Liu (2006). "Negative regulation of the E3 ubiquitin ligase itch via Fyn-mediated tyrosine phosphorylation." Mol Cell **21**(1): 135-141.

Yau, T. O., T. H. Leung, S. Lam, O. F. Cheung, E. K. Tung, P. L. Khong, A. Lam, S. Chung and I. O. Ng (2009). "Deleted in liver cancer 2 (DLC2) was dispensable for development and its deficiency did not aggravate hepatocarcinogenesis." PLoS One **4**(8): e6566.

Yeung, B., K. C. Ho and X. Yang (2013). "WWP1 E3 ligase targets LATS1 for ubiquitin-mediated degradation in breast cancer cells." PLoS One **8**(4): e61027.

Yohe, M. E., K. Rossman and J. Sondek (2008). "Role of the C-terminal SH3 domain and N-terminal tyrosine phosphorylation in regulation of Tim and related Dbl-family proteins." Biochemistry **47**(26): 6827-6839.

Yohe, M. E., K. L. Rossman, O. S. Gardner, A. E. Karnoub, J. T. Snyder, S. Gershburg, L. M. Graves, C. J. Der and J. Sondek (2007). "Auto-inhibition of the Dbl family protein Tim by an N-terminal helical motif." J Biol Chem **282**(18): 13813-13823.

Young, P., Q. Deveraux, R. E. Beal, C. M. Pickart and M. Rechsteiner (1998). "Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a." J Biol Chem **273**(10): 5461-5467.

Yu, L., M. C. Hebert and Y. E. Zhang (2002). "TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses." Embo J **21**(14): 3749-3759.

Yu, L., X. Liu, K. Cui, Y. Di, L. Xin, X. Sun, W. Zhang, X. Yang, M. Wei, Z. Yao and J. Yang (2015). "SND1 Acts Downstream of TGFbeta1 and Upstream of Smurf1 to Promote Breast Cancer Metastasis." Cancer Res **75**(7): 1275-1286.

Zaarour, R. F., D. Chirivino, L. Del Maestro, L. Daviet, A. Atfi, D. Louvard and M. Arpin (2012). "Ezrin ubiquitylation by the E3 ubiquitin ligase, WWP1, and consequent regulation of hepatocyte growth factor receptor activity." PLoS One **7**(5): e37490.

Zegers, M. M. and P. Friedl (2014). "Rho GTPases in collective cell migration." Small GTPases **5**: e28997.

Zhang, S., T. Fei, L. Zhang, R. Zhang, F. Chen, Y. Ning, Y. Han, X. H. Feng, A. Meng and Y. G. Chen (2007). "Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the

nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation." Mol Cell Biol **27**(12): 4488-4499.

Zhang, S., Q. Tang, F. Xu, Y. Xue, Z. Zhen, Y. Deng, M. Liu, J. Chen, S. Liu, M. Qiu, Z. Liao, Z. Li, D. Luo, F. Shi, Y. Zheng and F. Bi (2009). "RhoA regulates G1-S progression of gastric cancer cells by modulation of multiple INK4 family tumor suppressors." Mol Cancer Res **7**(4): 570-580.

Zhang, X., S. V. Srinivasan and J. B. Lingrel (2004). "WWP1-dependent ubiquitination and degradation of the lung Kruppel-like factor, KLF2." Biochem Biophys Res Commun **316**(1): 139-148.

Zhang, Y. E. (2009). "Non-Smad pathways in TGF-beta signaling." Cell Res **19**(1): 128-139.

Zhao, D., X. Zhi, Z. Zhou and C. Chen (2012). "TAZ antagonizes the WWP1-mediated KLF5 degradation and promotes breast cell proliferation and tumorigenesis." Carcinogenesis **33**(1): 59-67.

Zhao, J., R. K. Mialki, J. Wei, T. A. Coon, C. Zou, B. B. Chen, R. K. Mallampalli and Y. Zhao (2013). "SCF E3 ligase F-box protein complex SCF(FBXL19) regulates cell migration by mediating Rac1 ubiquitination and degradation." Faseb J **27**(7): 2611-2619.

Zhao, L., J. Huang, H. Zhang, Y. Wang, L. E. Matesic, M. Takahata, H. Awad, D. Chen and L. Xing (2011). "Tumor necrosis factor inhibits mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts via the ubiquitin E3 ligase Wwp1." Stem Cells **29**(10): 1601-1610.

Zheng, Y. (2001). "Dbl family guanine nucleotide exchange factors." Trends Biochem Sci **26**(12): 724-732.

Zhi, X. and C. Chen (2011). "WWP1: a versatile ubiquitin E3 ligase in signaling and diseases." Cell Mol Life Sci **69**(9): 1425-1434.

Zhi, X., D. Zhao, Z. Zhou, R. Liu and C. Chen (2012). "YAP promotes breast cell proliferation and survival partially through stabilizing the KLF5 transcription factor." Am J Pathol **180**(6): 2452-2461.

Zhou, Z., R. Liu and C. Chen (2012). "The WWP1 ubiquitin E3 ligase increases TRAIL resistance in breast cancer." Int J Cancer **130**(7): 1504-1510.



### Présentations et Congrès

Durant ma thèse, j'ai pu présenter mes travaux de thèse lors de différents congrès et séminaires scientifiques :

- Séminaire CDR St Antoine  
Paris, 2 juin 2014  
Présentation orale
- 15<sup>ème</sup> journées de l'école doctorale Physiologie et Physiopathologie,  
UPMC, 22-23 mai 2014  
Présentation orale
- 9<sup>ème</sup> séminaire annuel du CDR St-Antoine,  
Fontainebleau 7-8 novembre 2013  
Poster
- Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on **The Ubiquitin Family**,  
Cold Spring, New-York, United States, 14-18 mai 2013  
Poster
- 8<sup>ème</sup> séminaire annuel du CDR St-Antoine,  
Fontainebleau 18-19 octobre 2012  
Poster